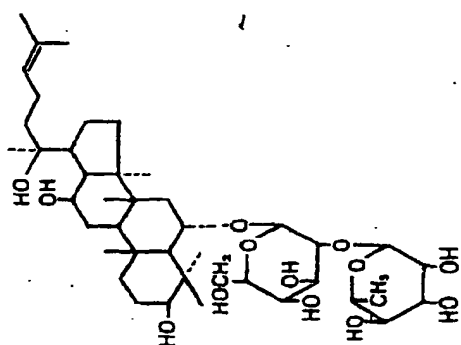
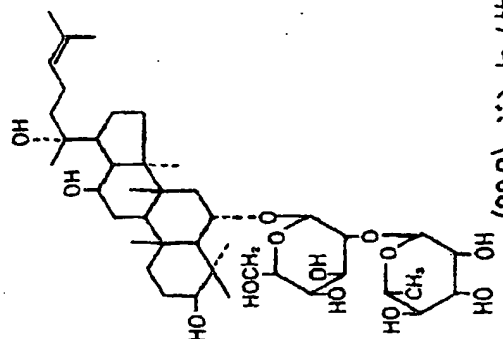


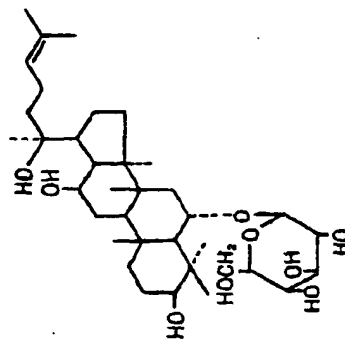
ジンセノサイド-Rg₁



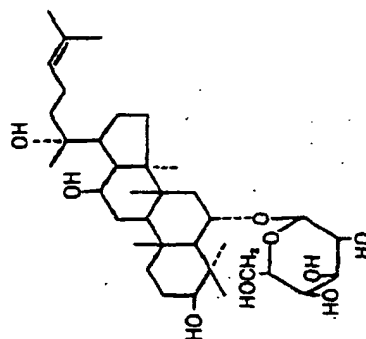
ジンセノサイド-Rg₂



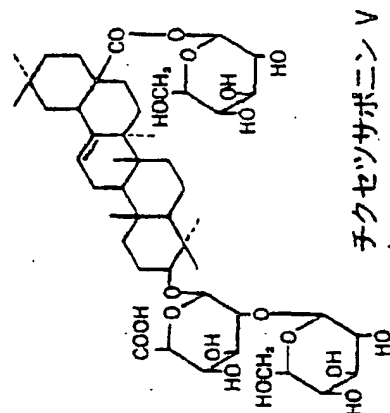
(20*R*)-ジンセノサイド-Rg₂*



ジンセノサイド-Rh₁

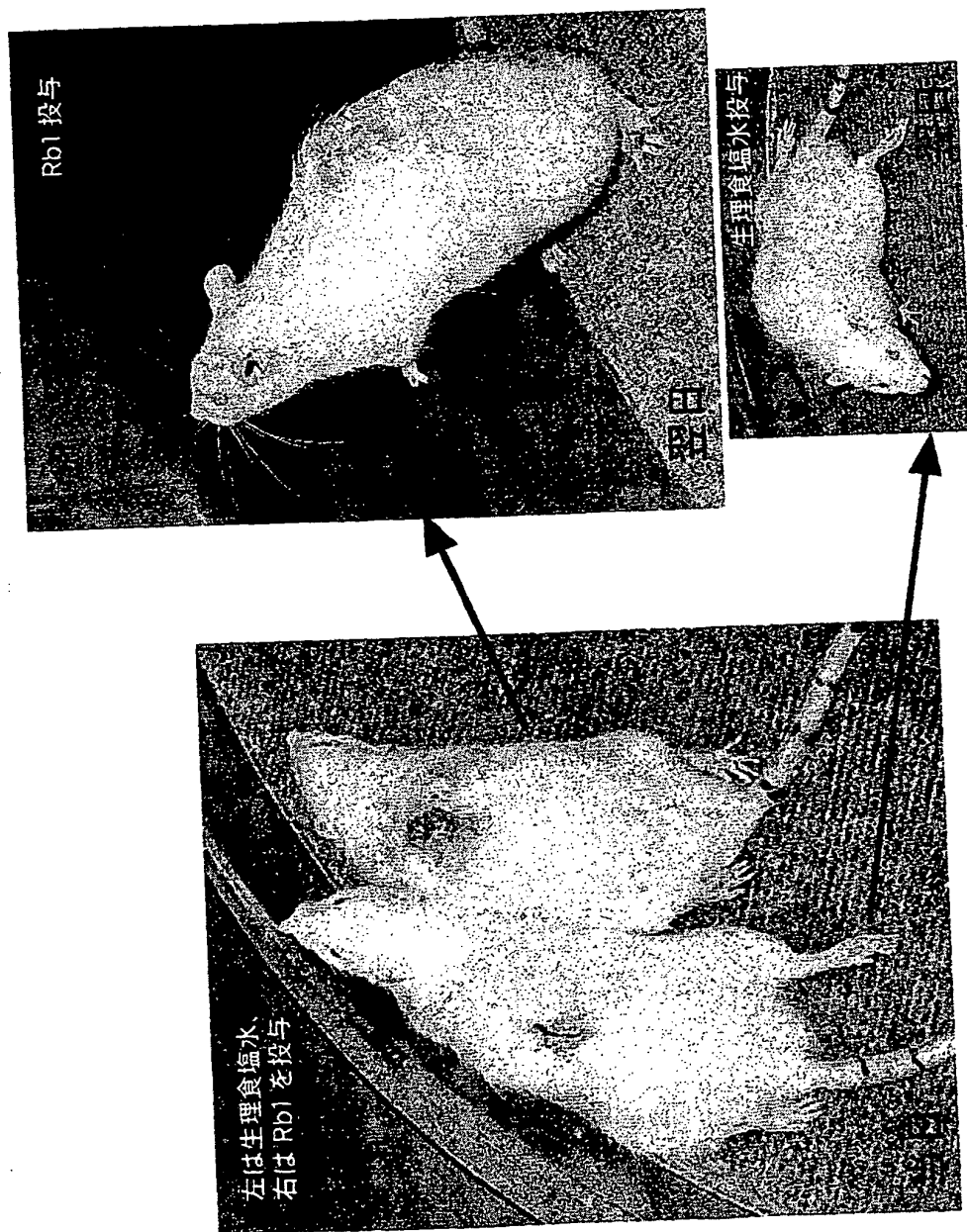


(20*R*)-ジンセノサイド-Rh₁*

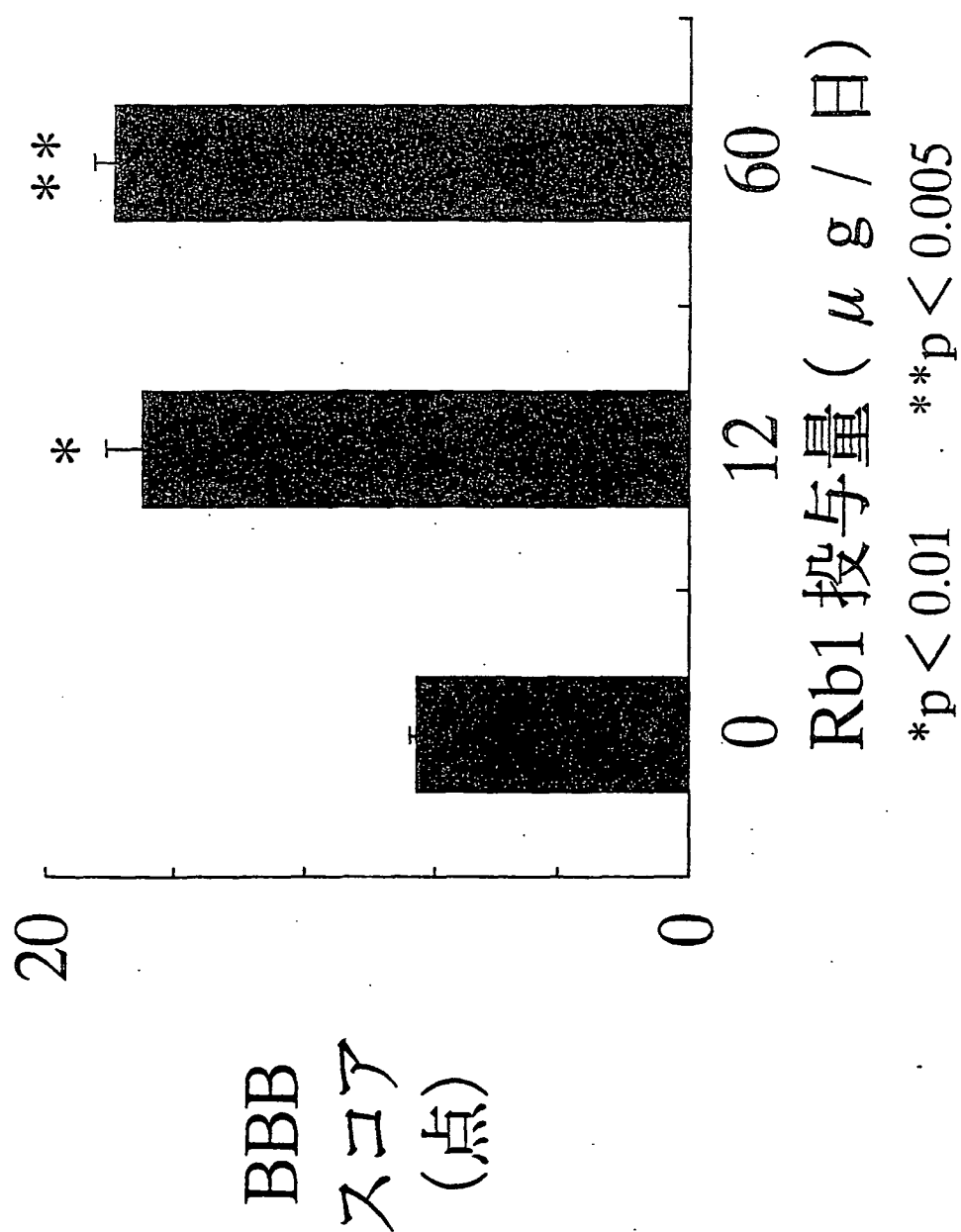


チャクセツサポニン V
(ジンセノサイド-Ro)

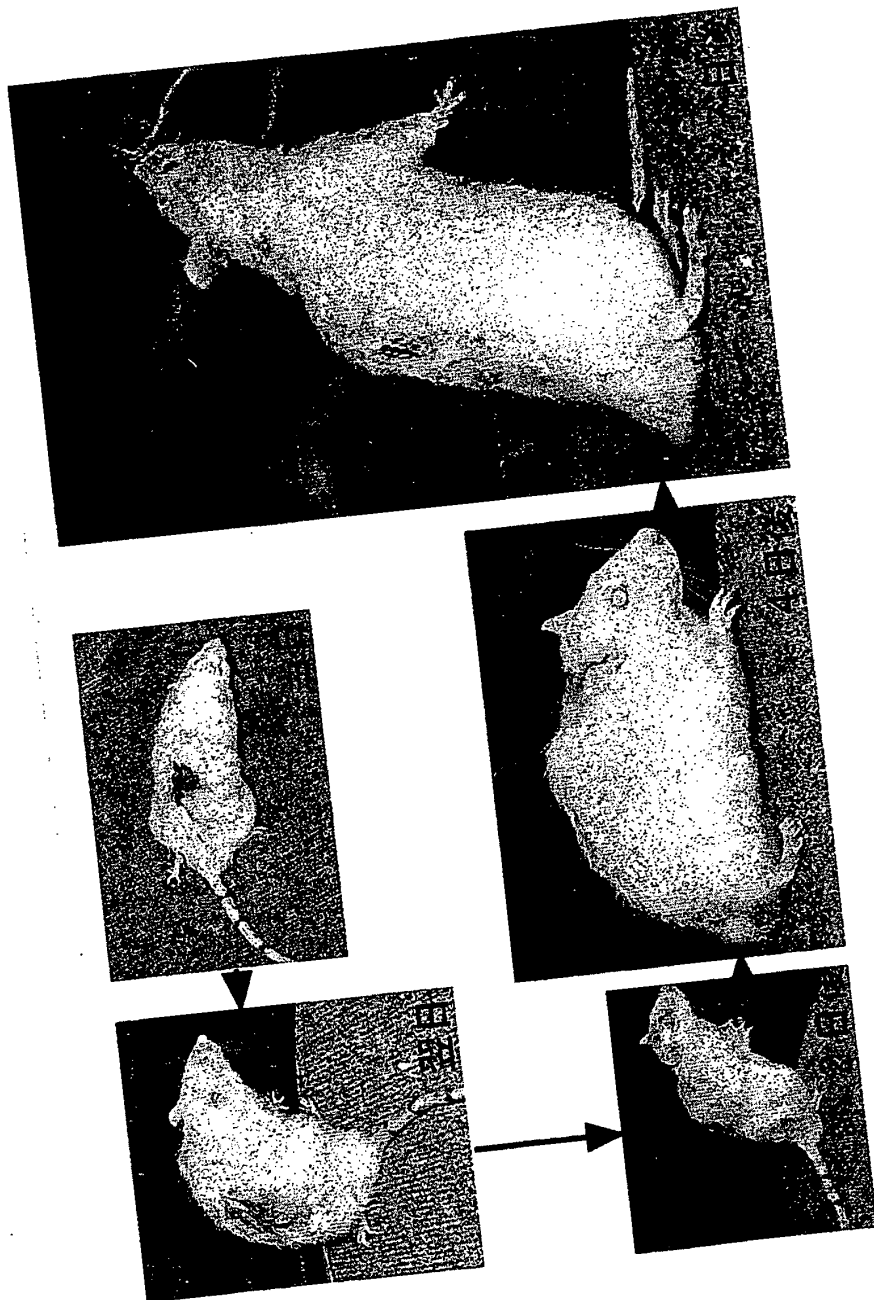
第 16 図



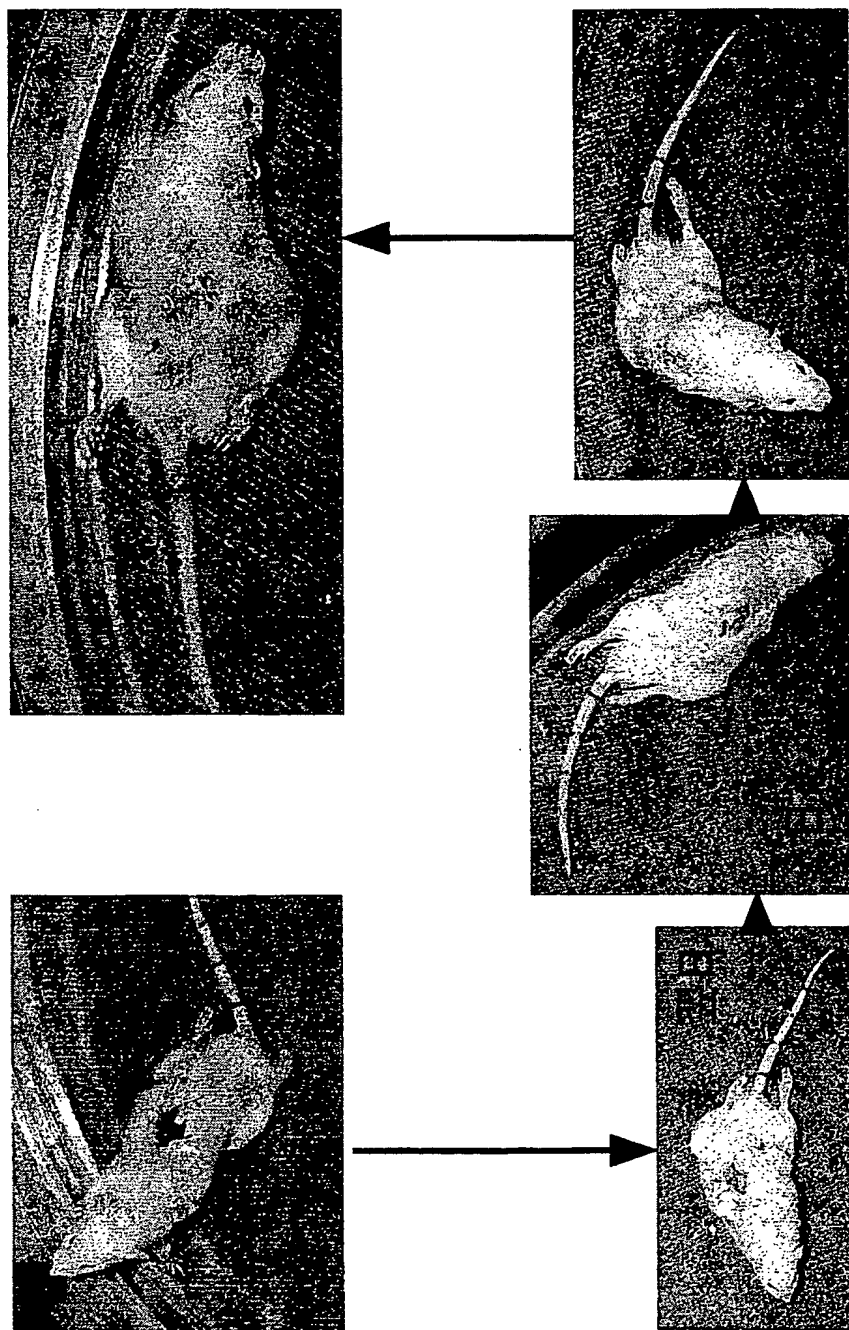
第 17 図



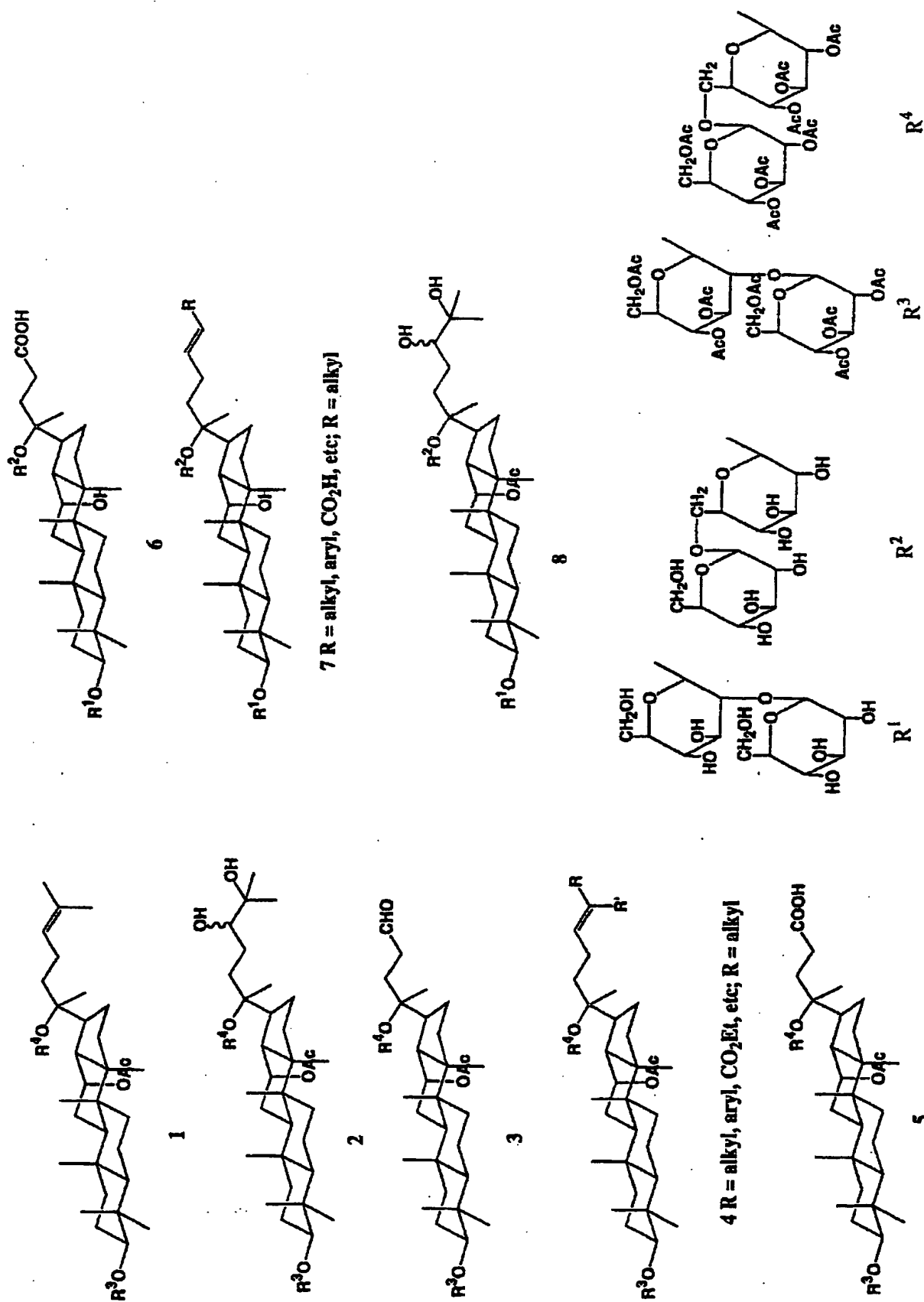
第 18 図



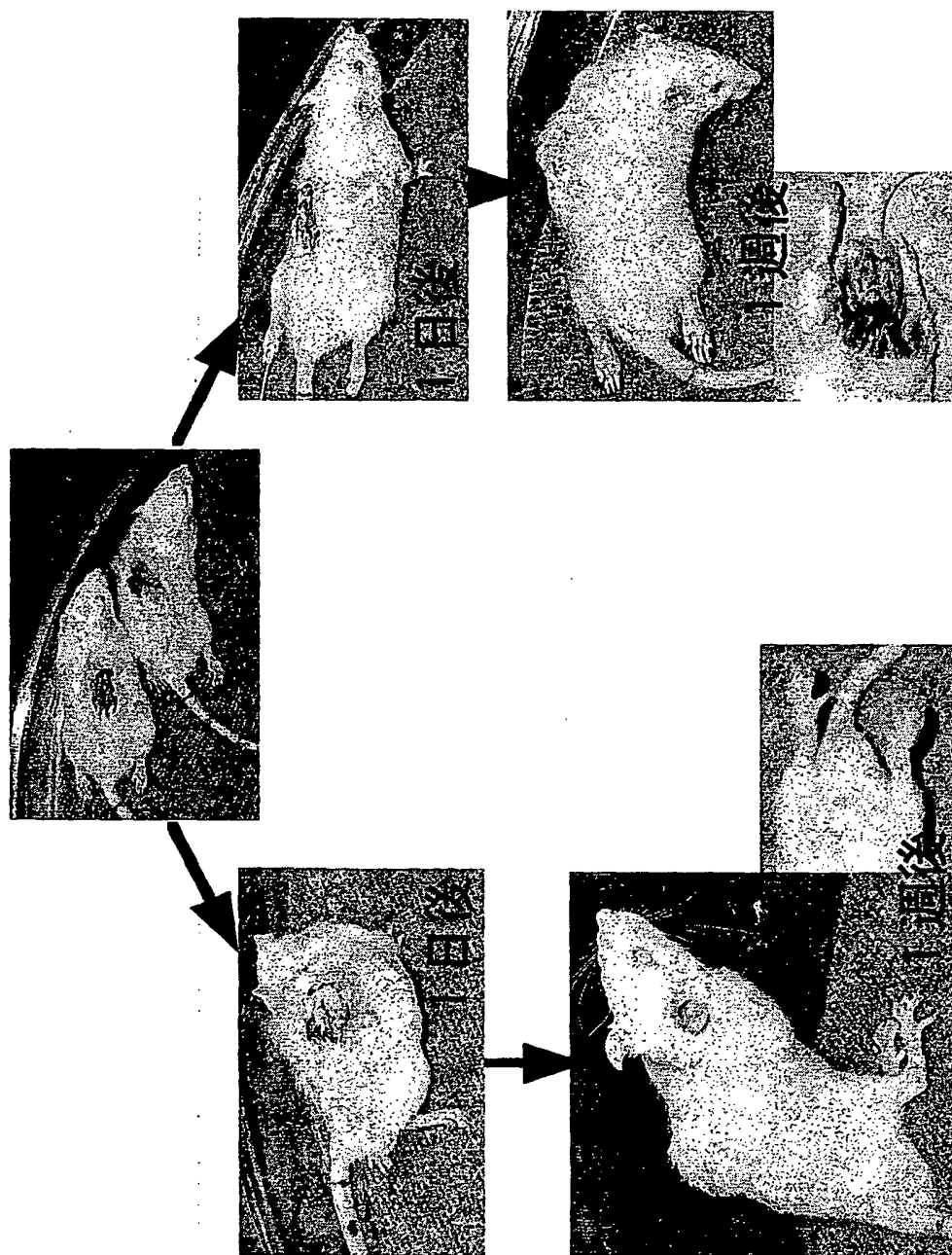
第 19 図

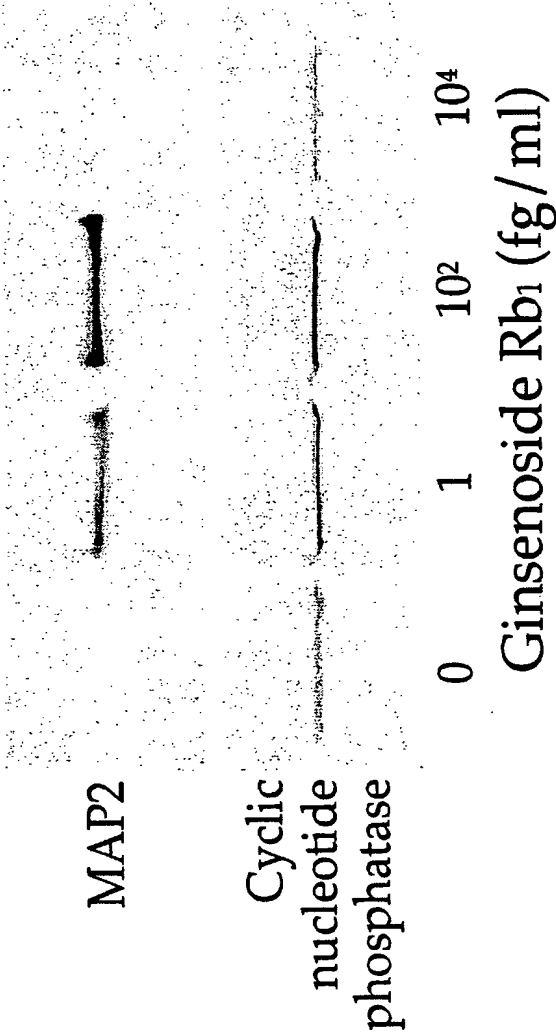


第 20 図

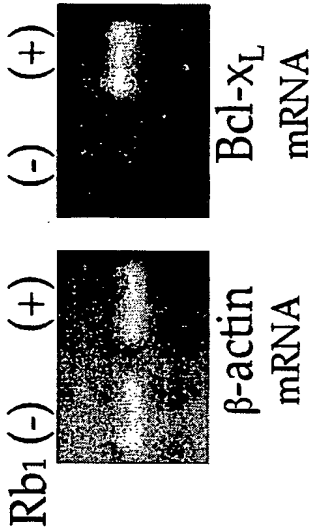


第 21 図





RT-PCR

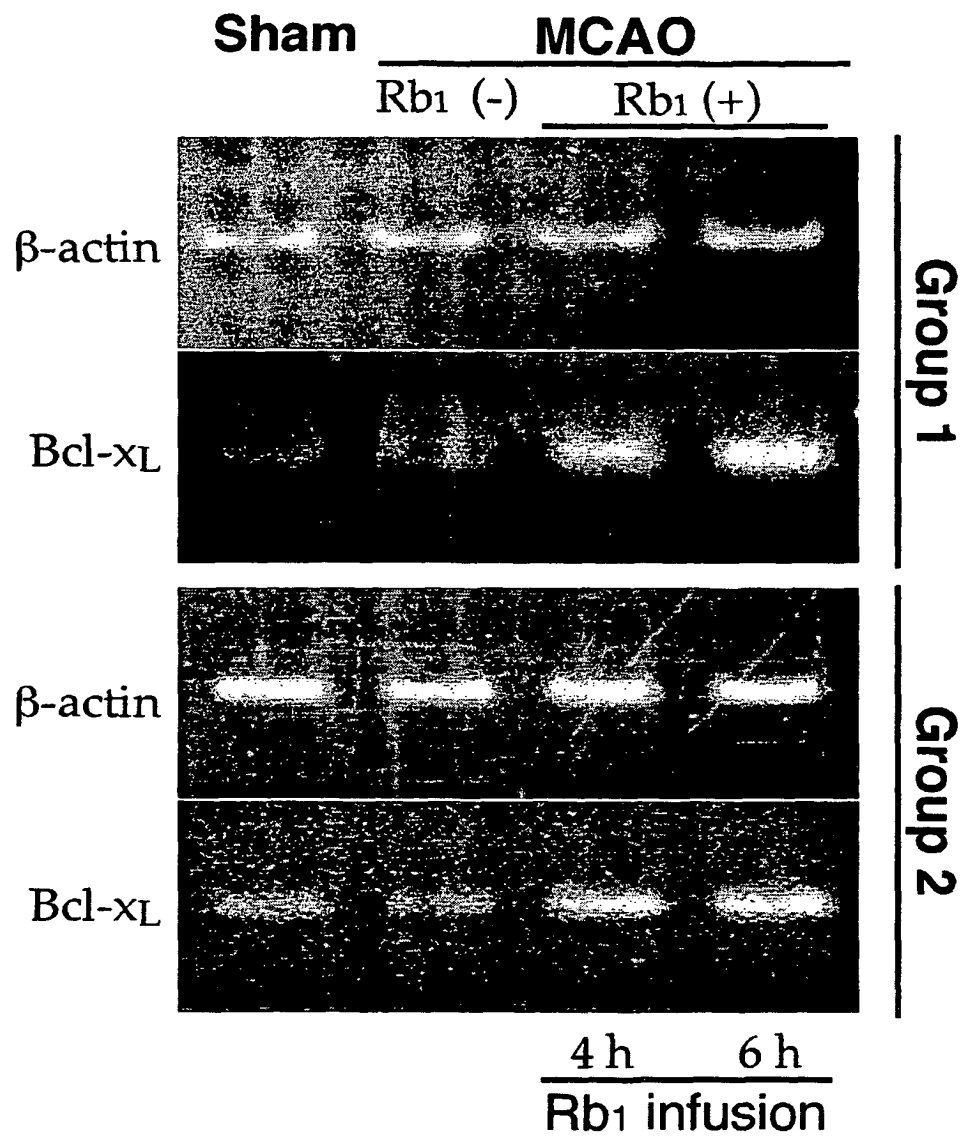


Immunoblotting

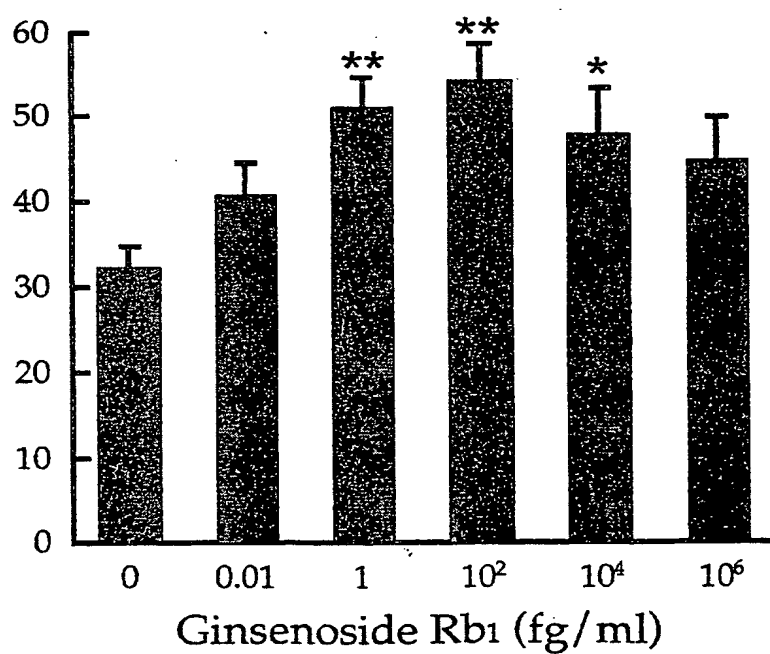
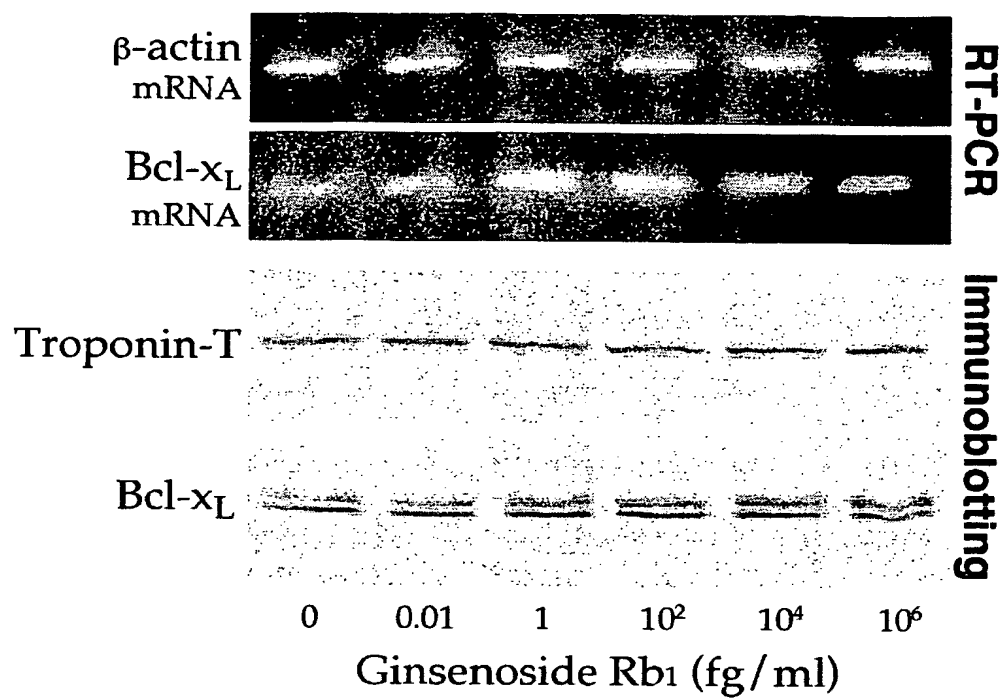
Bcl-x_L



第 2 4 図



第 2 5 図

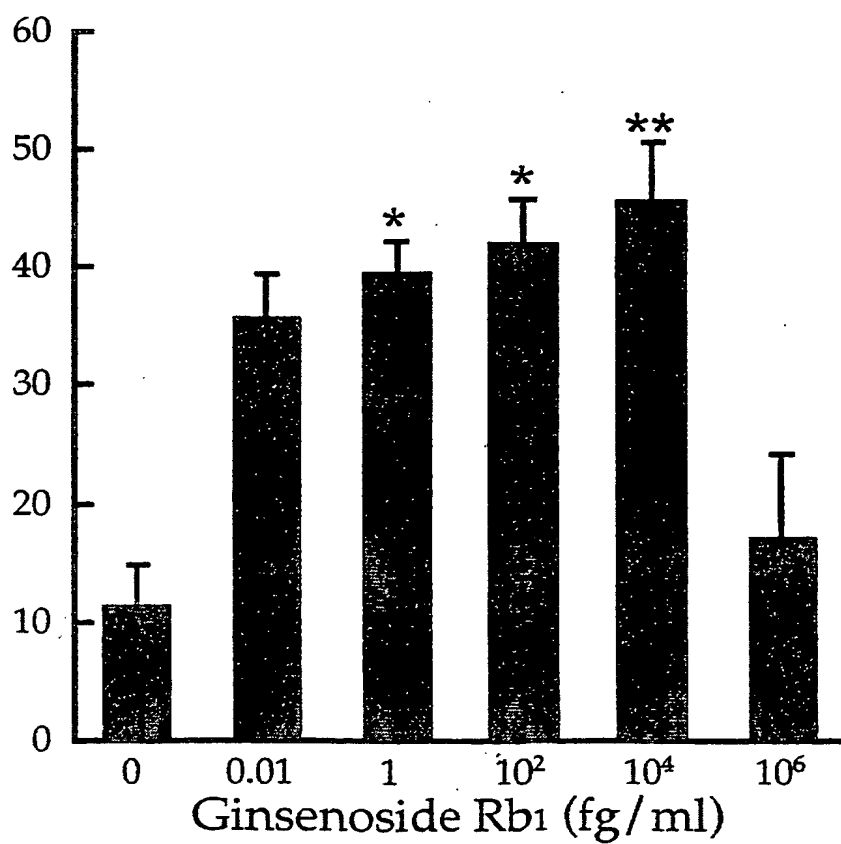


** $p < 0.01$ * $p < 0.05$

第 26 図

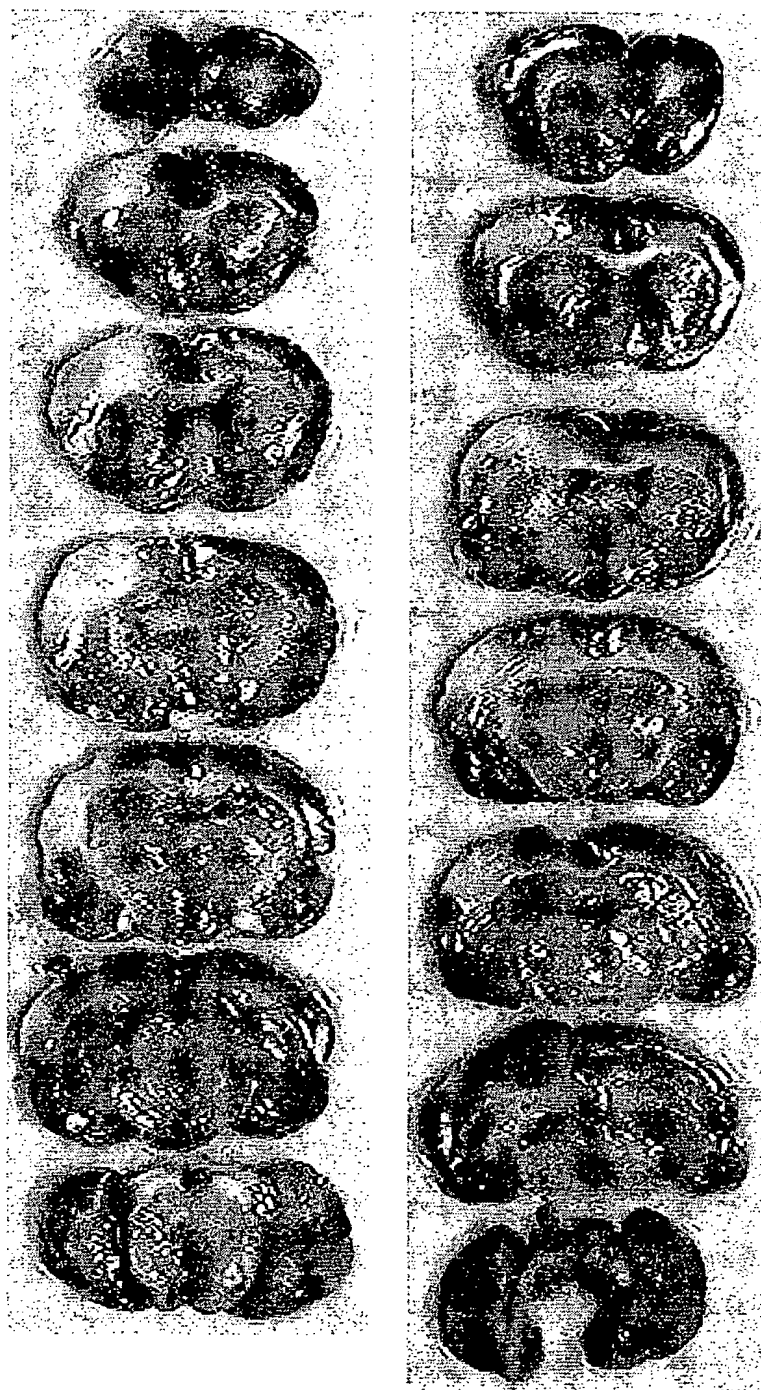
 α -Actinin

0 10^{-2} 1 10^2 10^4 10^6
Ginsenoside Rb₁ (fg/ml)



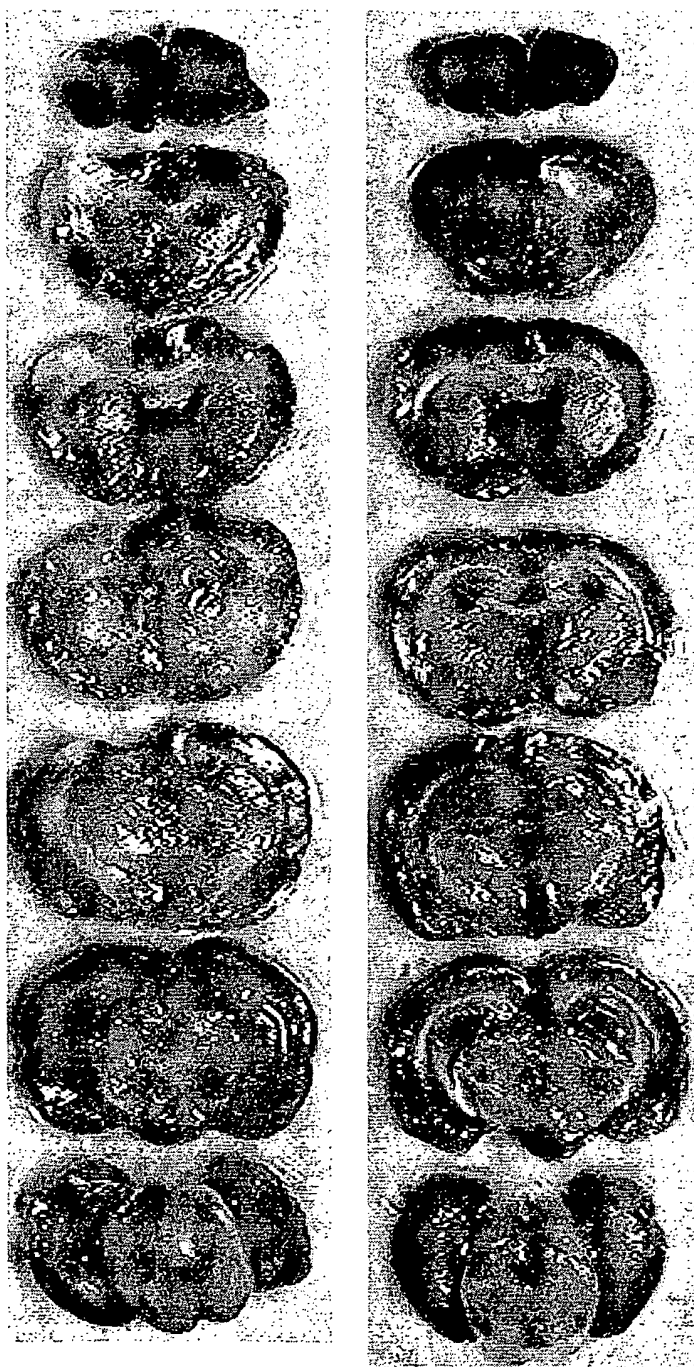
** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ vs Rb₁=0

第 27 図



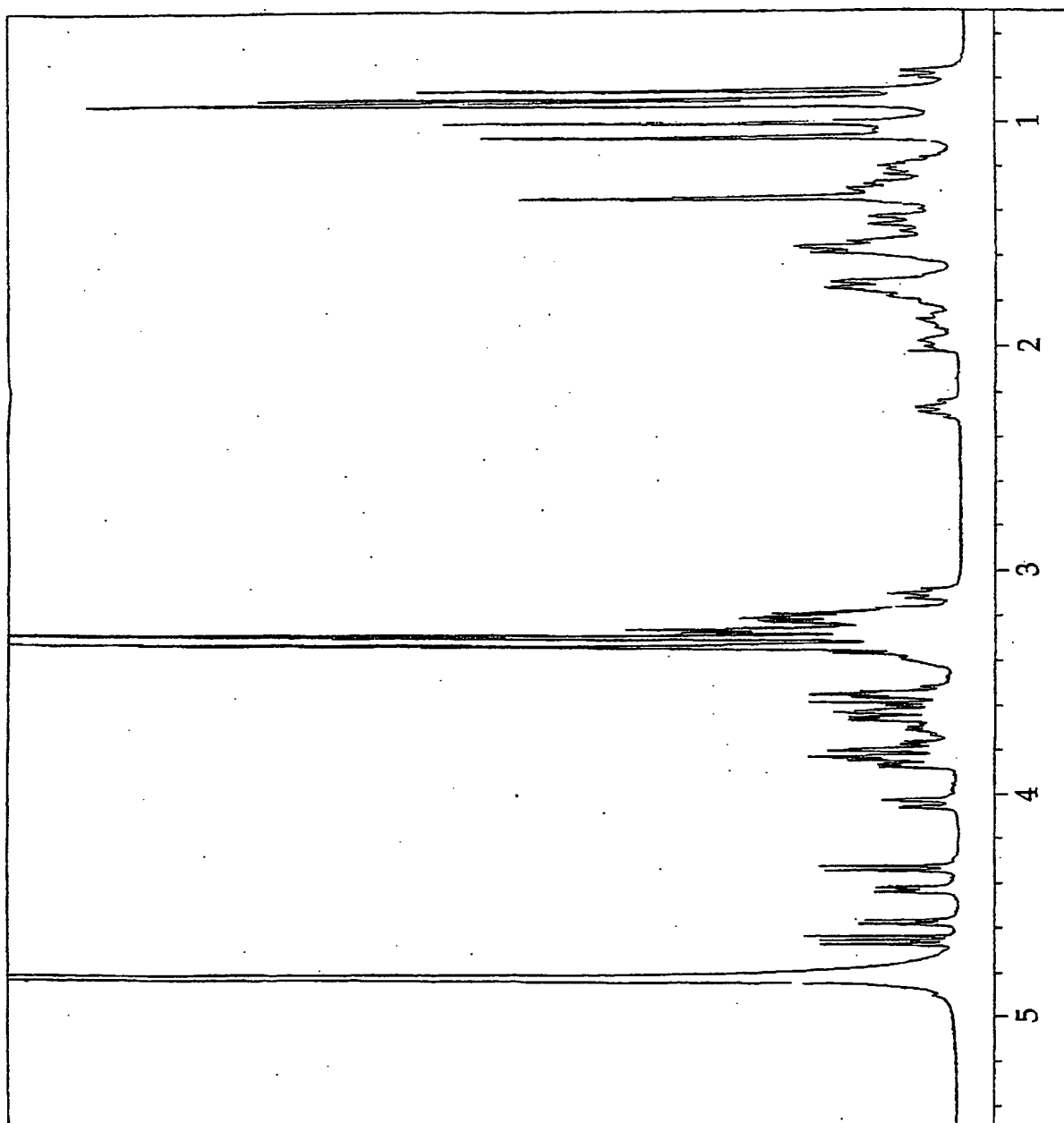


第 28 図





第 29 図





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00,
G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00,
G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JQ Li et al., "Study on the anti-apoptotic mechanism of ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons", Acta Pharmaceutica Sinica, Vol.32, No.6, pp.406-410, 1997	2-5, 9, 18-21 81, 83-89
X	Sung-Ho Kim et al., "Radioprotective Effect of Red Ginseng in Irradiated Mice with High and Low Dose of Radiation", Korean J. Ginseng Sci., Vol.22, No.1, pp.66-72, 1998	2-5, 9
X Y	ZHANG Ying-Ge et al., "Influences of ginsenosides Rb1 and Rg1 on reversible focal brain ischemia in rats", Acta Pharm. Sinica, Vol. 17, No.1, pp.44-48, 1996	18-21, 24, 25, 43, 47 22, 23, 27, 44-46, 81-89
X Y	Neuroscience Research, Vol.28, pp.191-200, 1997	18-21 81-89
X Y	Acta Pharmaceutica Sinica, Vol.30, No.9, 1995	18-21 81-89



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 September, 2000 (18.09.00)

Date of mailing of the international search report
26 September, 2000 (26.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04102

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZANG Ying-Ge et al., "Protective Effects of Total Saponins of Pana Ginseng on ischemia-reperfusion injury in rat brains", Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, Vol.8, No.1, pp.7-12, 1994	18-21,37-39
X	CHU, Guoxiang et al., "Protective effect of ginsenoside on acute cerebral ischemia/reperfusion injury of rats", Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, Vol.3, No.1, pp.18-21, 1989	37-39,43,47,48
X Y	JIANG Yan et al., "Influences of ginsenosides Rb1, Rb2, and Rb3, on electric and contractile activities of normal and damaged cultured myocardiocytes", Acta Pharmacologica Sinica, Vol.13, No.5, pp.403-406, 1992	40,42 41
X Y	FANG Yun-xian et al., "Beneficial changes in prostacyclin and thromboxane A ₂ by ginsenosides in myocardial infarction and reperfusion injury of dogs", Acta Pharmacologica Sinica, Vol.7, No.3, pp.222-226, 1986	40,44,49,52 41,42
X Y	Xiu Chen, "CARDIOVASCULAR PROTECTION BY GINSENOSES AND THEIR NITRIC OXIDE RELEASING ACTION", Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol.23, No.8, pp.728-732, 1996	40,42 41
X Y	LI Yuan-Jian, "THE PROTECTIVE EFFECT OF GINSENOSES AND ITS COMPONENTS ON MYOCYTES ANOXIA/REOXYGENATION AND MYOCARDIAL REPERFUSION INJURY", Acta Pharmaceutica Sinica, Vol.22, No.1, pp.1-5, 1987	40,42 41
A	Matao Kanaoka et al., "Studies on the Enzyme Immunoassay of Bio-active Constituents in Oriental Medicinal Drugs. VI. Enzyme Immunoassay of Ginsenoside Rb1 from Panax ginseng", Chem. Pharm. Bull., Vol.40, No.2, pp.314-317, 1992	74-80
Y	Noriko KONDO et al., "Studies on the Constituents of Himalayan Ginseng, Panax pseudoginseng. I. The Structure of the Saponins", Chem. Pharm. Bull., Vol.21, No.13, pp.2702-2711, 1973	74-80
P,X	JP, 2000-159793, A (Taisho Pharmaceut. Co., Ltd.), 13 June, 2000 (13.06.00), (Family: none)	2,3,5,9,40,41
X	JP, 6-316527, A (Tetsuo MORI), 15 November, 1994 (15.11.94), (Family: none),	18,19
X Y	WO, 90/08315, A (PANG P K T), 26 July, 1990 (26.07.90), & JP, 4-504414, A & US, 4966893, A & EP, 453515, A & US, 513878, A & DE, 69032201, B & KR, 160104, B	18-21 81-89

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04102

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box. No. II of continuation of first sheet (1)

Inventions as set forth in claims 1, 2, 18, 40 and 43 pertain respectively to 1) medicinal compositions for promoting the expression of a cell death inhibitory gene product Bcl-XL, 2) medicinal compositions for inhibiting apoptosis or apoptosis-like cell death, 3) medicinal compositions for treating, preventing or managing brain and nerve diseases, 4) medicinal compositions for treating, preventing or managing heart diseases, and 5) preparations for intravenous administration, each comprising ginseng, its extract, ginseng components, metabolites thereof or salts thereof. Inventions as set forth in claims 53, 56, 58 and 60 pertain respectively to 5) medicinal compositions for preventing, treating, managing or ameliorating edema in vital tissues, 6) medicinal compositions for preventing, treating or managing bed sore, 7) medicinal compositions for preventing, treating or managing neuroparalysis, and 8) medicinal compositions for preventing, treating or managing urination disorder or dyschezia, each comprising ginsenoside Rb1, its metabolites or salts thereof.

Invention as set forth in claim 74 pertains to 9) dihydroginsenoside Rb1 represented by the structural formula (II), its metabolites or salts thereof.

Invention as set forth in claim 81 pertains to 10) a method for searching an active ingredient for preventing, managing or treating diseases in nerve tissues or spinal tissues by using as a lead compound ginseng, its extract, ginseng components, metabolites thereof or salts thereof.

Invention as set forth in claim 86 pertains to 11) use of one of ginseng saponin fractionation components or metabolites thereof as a lead compound in searching remedies for nerve trauma, remedies for spinal injury, remedies for head trauma, brain cell protecting agents or nerve cell protecting agents.

Since the above subjects 1) to 11) differ from each other in use or the like, these inventions as set forth in 1) to 11) are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Such being the case, this international application does not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 32, no. 6, p406-410, 1997 "Study on the anti-apoptotic mechanism of ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons" JQ Li et al	2-5, 9, 18-21 81, 83-89
X	Korean J. Ginseng Sci., vol. 22, no. 1, p66-72, 1998 "Radioprotective Effect of Red Ginseng in Irradiated Mice with High and Low Dose of Radiation" Sung-Ho Kim et al	2-5, 9
X	Acta Pharm. Sinica, vol. 17, no. 1, p44-48, 1996 "Influences of ginsenosides Rb1 and Rg1 on reversible focal brain ischemia in rats" ZHANG Ying-Ge et al	18-21, 24, 25, 43, 47
Y		22, 23, 27, 44-

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.09.00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀



4C

8415

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Neuroscience Research vol. 28, p191-200, 1997	46, 81-89
Y		18-21
X	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 30, no. 9, 1995	81-89
Y		18-21
X	Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 8, no. 1, p7-12, 1994 "Protective Effects of Total Saponins of Panax Ginseng on ischemia-reperfusion injury in rat brains" ZHANG Ying-Ge et al	81-89
X	Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 3, no. 1, p18-21, 1989 "Protective effect of ginsenoside on acute cerebral ischemia/reperfusion injury of rats" CHU, Guoxiang et al	18-21, 37-39
X	Acta Pharmacologica Sinica, vol. 13, no. 5, p403-406, 1992 "Influences of ginsenosides Rb1, Rb2, and Rb3, on electric and contractile activities of normal and damaged cultured myocardiocytes" JIANG Yan et al	37-39, 43, 47, 48
Y		40, 42
X	Acta Pharmacologica Sinica, vol. 7, no. 3, p222-226, 1986 "Beneficial changes in prostacyclin and thromboxane A ₂ by ginsenosides in myocardial infarction and reperfusion injury of dogs" FANG Yun-xiang et al	41
Y		40, 44, 49, 52
X	Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, vol. 23, no. 8. p728-732, 1996 "CARDIOVASCULAR PROTECTION BY GINSENOSES AND THEIR NITRIC OXIDE RELEASING ACTION" Xiu Chen	41, 42
Y		40, 42
X	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 22, no. 1, p1-5, 1987 "THE PROTECTIVE EFFECT OF GINSENOSES AND ITS COMPONENTS ON MYOCYTES ANOXIA/REOXYGENATION AND MYOCARDIAL REPERFUSION INJURY" LI Yuan-Jian	41
Y		40, 42
A	Chem. Pharm. Bull., vol. 40, no. 2, p314-317, 1992 "Studies on the Enzyme Immunoassay of Bio-active Constituents in Oriental Medicinal Drugs. VI. Enzyme Immunoassay of Ginsenoside Rb1 from Panax ginseng" Matao Kanaoka et al	74-80
Y	Chem. Pharm. Bull., vol. 21, no. 13, p2702-2711, 1973 "Studies on the Constituents of Himalayan Ginseng, Panax pseudoginseng. I. The Structure of the Saponins" Noriko Kondo et al	74-80
P, X	JP, 2000-159793, A (大正製薬株式会社) 13. 6月. 2000 (13. 06. 00) ファミリーなし	2, 3, 5, 9, 40
X	JP, 6-316527, A (毛利哲朗) 15. 11月. 1994 (15. 11. 94) ファミリーなし	41
X	WO, 90/08315, A (PANG P K T) 26. 7月. 1990 (26. 07. 90) & JP, 4-504414, A&US, 4966893, A&EP, 453515, A&US, 5137878, A&DE, 69032201, B&KR, 160104, B	18, 19
Y		18-21
		81-89

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1、2、18、40、43は、薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなるそれぞれ1) 細胞死抑制遺伝子産物Bcl-xLの発現を促進させるための医薬組成物、2) 細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑制用医薬組成物、3) 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物、4) 心臓疾患の治療、予防または処置のための医薬組成物又は5) 静脈内投与製剤に係わる発明である。また、請求の範囲53、56、58、60は、ジンセノサイドRb1もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるそれぞれ5) 生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物、6) 褥創の予防・治療・処置用医薬組成物、(続き有り)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅱ欄の続き

7) 神経麻痺の予防・治療・処置用医薬組成物、8) 排尿障害もしくは排便障害の予防・治療・処置用医薬組成物に係わる発明である。

また、請求項74は、9) 構造式(Ⅱ)で示されるジヒドロジンセノサイドRb1もしくはその代謝産物又はそれらの塩に係わる発明である。

また、請求項81は、10) 薬用人参もしくはそのエキスまたは薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩をリード化合物として、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索する方法に係わる発明である。

また、請求項86は、11) 神経外傷治療剤、脊髄損傷治療剤、頭部外傷治療剤、脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としての薬用人参サポニン分画構成成分のいずれか又はその代謝産物の使用に係わる発明である。

そして、これらの上記1)～11)は、使用用途等において、それぞれ異なるものであるので、1)～11)に記載された発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められず、この国際出願は単一性を満たしているものとは認められない。



PCT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
9th Floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027
JAPON

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 01 November 2000 (01.11.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference JA903279	
International application No. PCT/JP00/04102	International filing date (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 30 August 1999 (30.08.99)
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
30 Augu 1999 (30.08.99)	11/243378	JP	11 Augu 2000 (11.08.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Khemais BRAHMI

Telephone No. (41-22) 338.83.38



TENT COOPERATION TRE

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
9th Floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 25 July 2000 (25.07.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference JA903279	International application No. PCT/JP00/04102

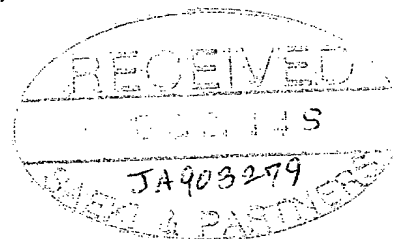
The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION (for all designated States except US)
SAKANAKA, Masahiro et al (for US)

International filing date : 22 June 2000 (22.06.00)
Priority date(s) claimed : 30 August 1999 (30.08.99)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 07 July 2000 (07.07.00)
List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : CN, KR, US



ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Masashi HONDA

Telephone No. (41-22) 338.83.38

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

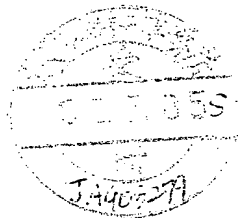
出願人代理人

佐伯 憲生

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛
ビル9階 たくみ特許事務所



殿

P C T

国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP00/04102

RO105

発送日（日．月．年）

04.07.00

出願人又は代理人
の書類記号

JA903279

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/04102

国際出願日（日．月．年）

22.06.00

優先日（日．月．年）

30.08.99

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、04日07月00年に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

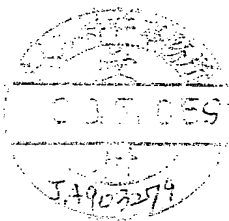
出願人代理人

佐伯 憲生

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所



殿

P C T

調査用写しの受理通知書

（法施行規則第39条）
〔PCT規則25.1〕

PCT/JP00/04102

SA202

発送日（日．月．年）

04.07.00

出願人又は代理人
の書類記号

JA903279

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/04102

国際出願日（日．月．年）

22.06.00

優先日（日．月．年）

30.08.99

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日に受理したので通知する。

国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日に受理したので通知する。

04 日 07 月 00 年（受理の日）

2. ☐ 調査用写しには、コンピューター読取りが可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が添付されている。

3. 国際調査報告の作成期間

国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。

4. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/ISA/202（1998年7月）

権限のある職員


特 許 庁 長 官



特許協力条約に基づく国際出願願書

JA903279

原本(出願用) - 印刷日時 2000年06月22日 (22.06.2000) 木曜日 13時06分18秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.10.1999)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	JA903279
I	発明の名称	薬用人参からなる脳細胞または神経細胞保護剤
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	科学技術振興事業団
II-4ja	名称	Japan Science and Technology Corporation
II-4en	Name	332-0012 日本国
II-5ja	あて名:	埼玉県 川口市
II-5en	Address:	本町四丁目1番8号
		1-8, Honcho 4-chome
		Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012
		Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	阪中 雅広
III-1-4ja	氏名(姓名)	SAKANAKA, Masahiro
III-1-4en	Name (LAST, First)	791-0204 日本国
III-1-5ja	あて名:	愛媛県 温泉郡
III-1-5en	Address:	重信町大字志津川1191番地13
		1191-13, Oaza Shitsukawa, Shigenobu-cho
		Onsen-gun, Ehime 791-0204
		Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

JA903279

原本(出願用) - 印刷日時 2000年06月22日 (22.06.2000) 木曜日 13時06分18秒

III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	前田 信治 MAEDA, Nobuji 790-0903 日本国 愛媛県 松山市 東野5丁目甲911-69
III-2-5en	Address:	Ko 911-69, 5-chome, Higashino Matsuyama-shi, Ehime 790-0903 Japan
III-2-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-2-7	住所(国名)	日本国 JP
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	
III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	田中 潤也 TANAKA, Junya 791-0203 日本国 愛媛県 温泉郡 重信町大字横河原355-31
III-3-5en	Address:	355-31, Oaza Yokogawara, Shigenobu-cho Onsen-gun, Ehime 791-0203 Japan
III-3-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-3-7	住所(国名)	日本国 JP
III-4 III-4-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-4-2	右の指定国についての出願人である。	
III-4-4ja III-4-4en III-4-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	仲田 公彦 NAKATA, Kimihiko 799-3111 日本国 愛媛県 伊予市 下吾川853
III-4-5en	Address:	853, Shimoagawa Iyo-shi, Ehime 799-3111 Japan
III-4-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-4-7	住所(国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

JA903279


原本（出願用） - 印刷日時 2000年06月22日（22.06.2000）木曜日 13時06分18秒

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	佐伯 憲生 SAEKI, Norio 103-0027 日本国 東京都 中央区 日本橋三丁目15番2号
IV-1-2en	Address:	高愛ビル 9階 9th floor, Taka-ai Building 15-2, Nihonbashi 3-chome Chuo-ku, Tokyo 103-0027 Japan
IV-1-3	電話番号	03-5205-2521
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-5205-2522
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	CN KR US
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	先の出願日	1999年08月30日 (30.08.1999)
VI-1-2	先の出願番号	平成11年特許願第243378号
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	優先権 証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)

特許協力条約に基づく国際出願願書

JA903279

原本（出願用） - 印刷日時 2000年06月22日（22.06.2000）木曜日 13時06分18秒

VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	4	-
VIII-2	明細書	149	-
VIII-3	請求の範囲	8	-
VIII-4	要約	1	ja90327c.txt
VIII-5	図面	33	-
VIII-7	合計	195	
	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込を証明する書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号	なし	
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)		

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
 9th Floor, Taka-ai Building
 15-2, Nihonbashi 3-chome
 Chuo-ku, Tokyo 103-0027
 JAPON

JA903279

Date of mailing (day/month/year) 12 December 2001 (12.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION International filing date (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)
Applicant's or agent's file reference JA903279	
International application No. PCT/JP00/04102	
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,CN,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

KR

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Eliott PERETTI Telephone No. (41-22) 338.83.38
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

47
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference JA903279	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04102	International filing date (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)	Priority date (day/month/year) 30 August 1999 (30.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 35/78, 31/704, A61P 9/08, 25/00, 43/00, C07J 17/00, G01N 33/15, 33/50		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>6</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 13 November 2000 (13.11.00)	Date of completion of this report 07 August 2001 (07.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04102

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-149, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 1,3-7,10-15,19-21,24,25,33,35,41,42,45,46,50,53-89, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 2,9,17,18,23,27-32,34,36-40,44,47-49,51,52, filed with the letter of 20 April 2001 (20.04.2001)
- ☒ the drawings:
pages 1-19,21-29, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages 20, filed with the letter of 20 April 2001 (20.04.2001)
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. 8,16,22,26,43
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04102

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 3.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-7,9-15,17-21,23-25,27-42,44-89



Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

The inventions set forth in Claims 1, 2, 18, 40 and 43 relate to 1) pharmaceutical compositions for promoting expression of cell death suppressor gene product Bcl-XL, 2) pharmaceutical compositions for suppressing apoptosis of cells or apoptosis-like cell death, 3) pharmaceutical compositions for treating, preventing or managing brain and nerve conditions, 4) pharmaceutical compositions for treating, preventing or managing heart conditions, and 5) preparations for intravenous administration, respectively, containing ginseng, or an extract thereof, or a component of ginseng or a metabolite thereof or a salt thereof. The inventions set forth in Claims 53, 56, 58 and 60 relate to 5) pharmaceutical compositions for preventing, treating, managing or reducing oedema, 6) pharmaceutical preparations for preventing, treating or managing bed sores, 7) pharmaceutical preparations for preventing, treating or managing neural paralysis and 8) pharmaceutical preparations for preventing, treating or managing disorders of urination or defaecation, respectively, which contain ginsenoside Rb1 or a metabolite thereof or a salt thereof. The invention set forth in Claim 74 relates to 9) dihydroginsenoside Rb1 represented by structural formula (II) or a metabolite thereof or a salt thereof. The invention set forth in Claim 81 relates to 10) a method for screening active ingredients for preventing, managing or treating disease of nervous tissue or spinal cord tissue with medical ginseng or an extract thereof or a component of medical ginseng or a metabolite thereof or salt thereof as a lead compound.

The invention set forth in Claim 86 relates to 11)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

the use of a ginseng saponin fraction constituent or metabolite thereof as a lead compound for screening of agents for treating nervous trauma, agents for treating spinal cord injury, agents for treating cranial trauma, agents for protecting brain cells or agents for protecting nerve cells.

1) to 11) above differ from one another in their applications, etc.; therefore, the group of inventions 1-11) is not a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, and this international application does not satisfy the condition of unity.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/04102

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7, 9-15, 17-21, 23-25, 27-42, 45, 46, 50, 53-69	YES
	Claims	44, 47-49, 51, 52	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-7, 9-15, 17-21, 23-25, 27-42, 45, 46, 50, 53-68	YES
	Claims	44, 47-49, 51, 52, 69, 72, 73, 81-89	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7, 9-15, 23-25, 27-42, 44-89	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

- Document 1: Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 32, No. 6, pp. 406-410, 1997
- Document 2: Korean J. Ginseng Sci., Vol. 17, No. 1, pp. 44-48, 1996
- Document 3: Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 17, No. 1, pp. 44-48, 1996
- Document 4: Neuroscience Research, Vol. 28, pp. 191-200, 1997
- Document 5: Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 30, No. 9, 1995
- Document 6: Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, Vol. 8, No.1, pp. 7-12, 1994
- Document 7: Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, Vol. 3, No. 1, pp. 18-21, 1989
- Document 8: Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 13, No. 5, pp. 403-406, 1992
- Document 9: Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 7, No. 3, pp. 222-226, 1986
- Document 10: Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol. 23, No. 8., pp. 728-732, 1996
- Document 11: Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 22, No. 1, pp. 1-5, 1987
- Document 12: Chem. Pharm. Bull., Vol. 40, No. 2, pp.



314-317, 1992

Document 13: Chem. Pharm. Bull., Vol. 21, No. 13, pp.
2702-2711, 1973

Document 14: JP, 316527, A (Testuo Mori) 15 November 1994
(15.11.94)

Document 15: WO, 90/08315, A (Pang P K T), 26 July 1990
(26.07.90) & JP, 4-504414, A & US, 4966893, A
& EP, 453515, A & US, 5137878, A & DE,
69032201, B & KR, 160104, B

Claims 1-7, 9-15, 17-21, 23-25, 27-42, 45, 46, 50,
53-68, 70, 71 and 74-80 are novel and involve an inventive
step, since they are not disclosed in Documents 1-15 and
are not obvious to a person skilled in the art from
disclosures in these documents.

Claims 44, 47 and 48 and Claims 49, 51 and 52 are
not novel, because they are disclosed in Documents 3 and 7
and Document 9, respectively.

A person skilled in the art could easily deduce
Claims 69, 72 and 73 from disclosure of the application of
ginsenoside Rb1 as a myocardial cell protecting agent in
Document 8 and the disclosure of ginsenoside Rb1 as a
preparation for intravenous administration in Documents 3
and 7. Similarly, from the disclosures in Documents 1-11
and 15 a person skilled in the art would have no
difficulty, having specified an active ingredient of
medical ginseng, in using this ingredient as a lead
compound to obtain active ingredients with similar
pharmacological effects, giving Claims 81-89.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/04102

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of:

V.

V-1 Opinion

Inventive step (IS) Claims 70, 71, 74-80 YES



手 続 補 正 書

(法第 11 条の規定による補正)

特許庁審査官

鶴見 秀紀 殿

5/2 2:30 PM JPO 外リ Tel

補正書、職権訂正

1. 国際出願の表示 PCT/JPO00/04102 補正された差替え頁の提出
すること。

2. 出願人 (代表者) 氏名 (名称) 科学技術振興事業団 不要部分/頁は削除/破棄
します。

Japan Science and Technology Corporation

山崎 受

あて名

〒332-0012

日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama

332-0012 JAPAN

国籍

日本国 JAPAN

住所

日本国 JAPAN

3. 代理人

氏 名

(10266) 弁理士 佐伯 憲生

SAEKI Norio



あて名

〒103-0027

日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2,

Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

4. 補正の対象

請求の範囲及び図面

5. 補正の内容

(1) 第150頁の請求の範囲第2項の文頭に「患部組織における細胞外液濃度が14.5 ng/ml以下になるように調整されている」を追記して補正するとともに、第150頁の請求の範囲第2項の「細胞」を、「、脳細胞、神経細胞、神経幹細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞、線維芽細胞、胆管上皮細胞、脂肪蓄積細胞、リンパ球、白血球、細網細胞、大食細胞もしくは形質細胞」に補正する。

(2) 第150頁の請求の範囲第8項を削除する。

(3) 第150頁の請求の範囲第9項の文頭に「請求の範囲第2項に記載の」を追記して補正する。

(4) 第151頁の請求の範囲第16項を削除する。

(5) 第151頁の請求の範囲第17項の「第35項」を、「第12項～第15項のいずれか」に補正する。

(6) 第151頁の請求の範囲第18項の文頭に「患部における細胞外液濃度が14.5 ng/ml以下になるように調整されている」を追記して補正するとともに、第151頁の請求の範囲第18項の「脳・神経」を、「神経組織又は脊髓組織の損傷による」に補正する。

(7) 第151頁の請求の範囲第22項を削除する。

(8) 第152頁の請求の範囲第23項の「第22項」を、「第18項～第21項のいずれか」に補正する。

(9) 第152頁の請求の範囲第26項を削除する。

(10) 第152頁の請求の範囲第27項の「第26項」を、「第18項～第25項のいずれか」に補正する。

(11) 第152頁の請求の範囲第28項の「第26項又は」を、削除する。

(12) 第152頁の請求の範囲第29項の「第26項又は」を、削除する。

(13) 第152頁の請求の範囲第30項の「第26項又は」を、削除する。

(14) 第152頁の請求の範囲第31項の「脳・神経」を、「神経組織又は脊髓組織の損傷による」に補正する。

(15) 第152頁の請求の範囲第32項の「脳・神経」を、「神経組織又は脊髓組織の損傷による」に補正する。

(16) 第152頁の請求の範囲第34項の「脳・神経」を、「神経組織又は脊髄組織の損傷による」に補正する。

(17) 第152頁の請求の範囲第36項の「脳・神経」を、「神経組織又は脊髄組織の損傷による」に補正する。

(18) 第153頁の請求の範囲第37項の「脳・神経」を、「神経組織又は脊髄組織の損傷による」に補正する。

(19) 第153頁の請求の範囲第38項の「脳卒中、脳梗塞」を、削除する。

(20) 第153頁の請求の範囲第39項の「脳・神経」を、「神経組織又は脊髄組織の損傷による」に補正し、第153頁の請求の範囲第39項の「頭部外傷、」を「頭部外傷又は」に補正するとともに、第153頁の請求の範囲第39項の「、脳血管性痴呆、脳梗塞、脳卒中又は一過性脳虚血発作」を削除する。

(21) 第153頁の請求の範囲第40項の文頭に「患部組織における細胞外液濃度が14.5 ng/ml以下になるように調整されている」を追記して補正する。

(22) 第153頁の請求の範囲第43項を削除する。

(23) 第153頁の請求の範囲第44項の「の濃度」、を「を」に補正するとともに、第153頁の請求の範囲第44項の「ある請求の範囲第43項に記載の」を、「含有してなる」に補正する。

(24) 第153頁の請求の範囲第47項の「第43項」を、「第44項」に補正する。

(25) 第154頁の請求の範囲第49項の「第43項」を、「第44項」に補正する。

(26) 第154頁の請求の範囲第51項の「第43項」を、「第44項」に補正する。

(27) 第154頁の請求の範囲第52項の「第43項」を、「第44項」に補正する。

(28) 図面第20図の化学構造8における「OAc」を、「OH」に補正する。

6. 添付書類の目録

(1) 請求の範囲第150頁～第~~157~~¹⁵⁶頁

(2) 図面24／33頁

請 求 の 範 囲

1. 薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x_L の発現を促進させるための医薬組成物。
2. (補正後) 患部組織における細胞外液濃度が 14.5 ng/ml 以下になるように調整されている薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、脳細胞、神経細胞、神経幹細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞、線維芽細胞、胆管上皮細胞、脂肪蓄積細胞、リンパ球、白血球、細網細胞、大食細胞もしくは形質細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物。
3. 薬用人蔘のエキスが薬用人蔘の抽出物である請求の範囲第1項又は第2項に記載の医薬組成物。
4. 薬用人蔘もしくはそのエキスが、コウジン末又はその抽出物である請求の範囲第1項又は第2項に記載の医薬組成物。
5. 薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩が、薬用人蔘の粗サポニン分画、非サポニン分画、精製サポニン類、又はサポニン分画構成成分もしくはその塩である請求の範囲第1項又は第2項に記載の医薬組成物。
6. 細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x_L の発現を促進させる組織が脳神経組織もしくは脊髄組織である請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の医薬組成物。
7. 細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x_L の発現を促進させる組織が肝臓又は脾臓である請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の医薬組成物。
8. (削除)
9. (補正後) 請求の範囲第2項に記載の細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死をきたす疾患の治療、予防、又は処置のための請求の範囲第2項～第5項のいずれかに記載の医薬組成物。
10. 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の医薬組成物。

11. 脳・神経疾患が脳血管性痴呆、脳梗塞又は脳卒中である請求の範囲第10項に記載の医薬組成物。
12. 経口投与用製剤である請求の範囲第1項～第11項のいずれかに記載の医薬組成物。
13. 哺乳動物に対する投与量が1日あたり $1/6 \sim 1/2$ g/kgである請求の範囲第12項に記載の医薬組成物。
14. 静脈内投与用製剤である請求の範囲第1項～第11項のいずれかに記載の医薬組成物。
15. 単回静脈内注入用製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第14項に記載の医薬組成物。
16. (削除)
17. (補正後) 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が $1 \sim 1450$ fg/mlもしくは $1 \sim 145000$ fg/mlである請求の範囲第12項～第15項のいずれかに記載の静脈内投与用製剤。
18. (補正後) 患部における細胞外液濃度が 14.5 ng/ml以下となるように調整されている薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物。
19. 薬用人参のエキスが薬用人参の抽出物である請求の範囲第18項に記載の医薬組成物。
20. 薬用人参もしくはそのエキスが、コウジン末又はその抽出物である請求の範囲第18項に記載の医薬組成物。
21. 薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩が、薬用人参の粗サポニン分画、非サポニン分画、精製サポニン類、又はサポニン分画構成成分もしくはその塩である請求の範囲第18項に記載の医薬組成物。
22. (削除)
23. (補正後) 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の濃度が $1 \sim 1450$ fg/mlもしくは $1 \sim 145$



000fg/mlである請求の範囲第18項～第21項のいずれかに記載の医薬組成物。

24. 静脈内投与用製剤である請求の範囲第18項～第23項のいずれかに記載の医薬組成物。

25. 単回静脈内注入用製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第24項に記載の医薬組成物。

26. (削除)

27. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、脊髄損傷である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

28. (補正後) 上肢もしくは下肢の麻痺を改善させることによるものである請求の範囲第27項に記載の医薬組成物。

29. (補正後) 排尿障害もしくは排便障害を改善させることによるものである請求の範囲第27項に記載の医薬組成物。

30. (補正後) 神経因性膀胱を改善させることによるものである請求の範囲第27項に記載の医薬組成物。

31. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が神経組織の二次変性である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

32. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が神経組織又は脊髄組織の外傷である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

33. 外傷が、脊髄損傷、神経外傷もしくは頭部外傷である請求の範囲第32項に記載の医薬組成物。

34. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患がオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死による疾患である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

35. オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死をきたす疾患が脊髄損傷である請求の範囲第34項に記載の医薬組成物。

36. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が脱髄である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

37. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が脳浮腫、脳神経組織

の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

38. (補正後) 脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫をきたす疾患が、脳出血、クモ膜下出血、頭部外傷、脊髄損傷、又は神経外傷である請求の範囲第37項に記載の医薬組成物。

39. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、脊髄損傷、頭部外傷又は神経外傷である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

40. (補正後) 患部組織における細胞外液濃度が 14.5 ng/ml 以下となるように調整されている薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心臓疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物。

41. 心臓疾患が心筋細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様心筋細胞死を伴うものである請求の範囲第40項に記載の医薬組成物。

42. 薬用人参のサポニン分画構成成分のいずれかがジンセノサイド R_b である請求の範囲第5項又は第21項に記載の医薬組成物。

43. (削除)

44. (補正後) 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなる静脈内投与用製剤。

45. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が 1 ng/ml 以下となるように調整されている請求の範囲第44項に記載の静脈内投与用製剤。

46. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が $1 \sim 100 \text{ fg/ml}$ もしくは $1 \sim 10000 \text{ fg/ml}$ である請求の範囲第45項に記載の静脈内投与用製剤。

47. (補正後) 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための請求の範囲第44項～第46項いずれかに記載の静脈内投与用製剤。

48. (補正後) 脳・神経疾患が脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷、脳血管性痴呆、

脳梗塞、脳卒中又は一過性脳虚血発作である請求の範囲第47項に記載の静脈内投与用製剤。

49. (補正後) 心臓疾患の治療、予防又は処置のための請求の範囲第44項～第46項いずれかに記載の静脈内投与用製剤。

50. 心臓疾患が、心筋細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様心筋細胞死を伴うものである請求の範囲第49項に記載の静脈内投与用製剤。

51. (補正後) 単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与製剤である請求の範囲第44項～第50項いずれかに記載の静脈内投与用製剤。

52. (補正後) 請求の範囲第44項～第51項のいずれかに記載の静脈内投与用製剤からなる脳細胞、神経細胞又は心筋細胞の保護剤。

53. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物。

54. 生体組織の浮腫が脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫である請求の範囲第53項に記載の医薬組成物。

55. 脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫をきたす疾患が、脳卒中、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、頭部外傷、脊髄損傷、又は神経外傷である請求の範囲第54項に記載の医薬組成物。

56. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる褥創の予防、処置又は治療用医薬組成物。

57. 褥創が脊髄損傷によるものである請求の範囲第56項に記載の医薬組成物。

58. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経麻痺の予防・治療・処置用医薬組成物。

59. 神経麻痺が脊髄損傷後の上肢または下肢の対麻痺である請求の範囲第58項に記載の医薬組成物。

60. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる排尿障害もしくは排便障害の予防・治療・処置用医薬組成物。

61. 排尿障害もしくは排便障害が脊髄損傷によるものである請求の範囲第60項に記載の医薬組成物。

~~62. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる~~

神経因性膀胱の予防・治療・処置用医薬組成物。

63. 神経因性膀胱が脊髄損傷によるものである請求の範囲第62項に記載の医薬組成物。

64. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトの細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x_Lの発現を促進させるための医薬組成物。

65. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイト保護剤。

66. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止するための医薬組成物。

67. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞の細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x_Lの発現を促進するための医薬組成物。

68. 心筋細胞の細胞死を伴う疾患の予防・治療又は処置のための請求の範囲第66項又は第67項に記載の医薬組成物。

69. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心筋細胞保護剤。

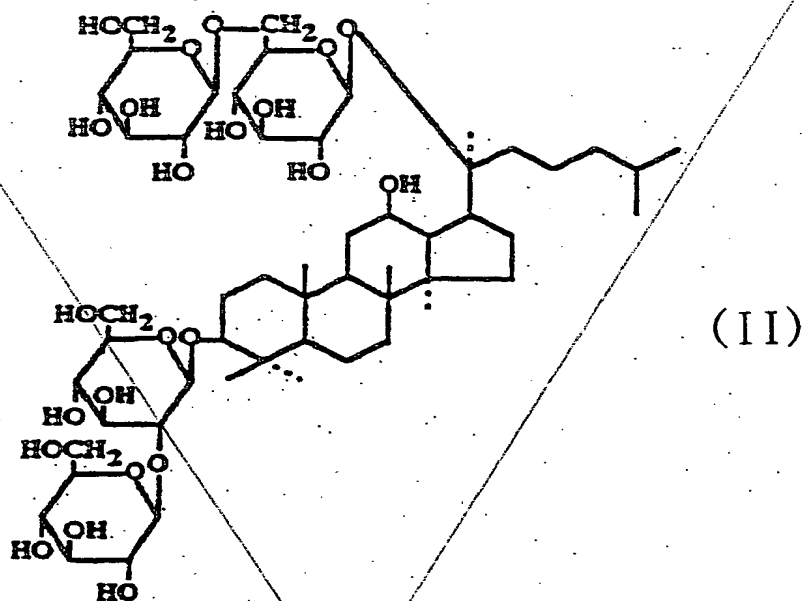
70. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩の患部における細胞外液濃度が1 ng/ml以下または約0.9 nM以下となる請求の範囲第53項～第69項のいずれかに記載の医薬組成物。

71. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩のその濃度が1～100 fg/ml (約0.9～90 fM) または1～10⁴ fg/ml (約0.9～9000 fM) である請求の範囲第70項に記載の医薬組成物。

72. 静脈内投与用製剤である請求の範囲第53項～第69項のいずれかに記載の医薬組成物。

73. 単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第53項～第69項のいずれかに記載の医薬組成物。

74. 下記構造式(II)で示されるジヒドロジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩。



75. 細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止するための請求の範囲第74項に記載の化合物もしくはその代謝物又はそれらの塩を含有してなる医薬組成物。

76. 細胞が、虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) の脳細胞又は神経細胞である請求の範囲第75項に記載の医薬組成物。

77. 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための、請求の範囲第74項に記載の化合物もしくはその代謝物又はそれらの塩を含有してなる医薬組成物。

78. 脳・神経疾患が、脳梗塞、脳卒中又は一過性脳虚血発作である請求の範囲第77項に記載の医薬組成物。

79. 静脈内投与用製剤である請求の範囲第75項～第78項のいずれかに記載の医薬組成物。

80. 単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第79項に記載の医薬組成物。

81. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩をリード化合物として、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索する方法。

82. 薬用人参のサポニン分画含有成分のいずれかがジンセノサイドRb₁である請求の範囲第81項に記載の方法。

83. 神経組織又は脊髄組織の疾患が、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患もしくは脳梗塞である請求の範囲第81項又は第82項に記載の方法。

84. 請求の範囲第81項～第83項のいずれかに記載の方法により得られた神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療剤。

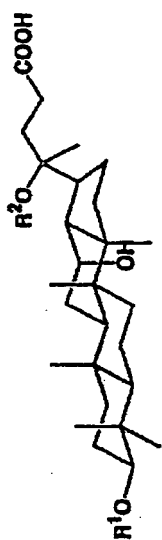
85. 神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索するためのリード化合物としての薬用人参サポニン分画構成成分のいずれか又はその代謝産物の使用。

86. 神経外傷治療剤、脊髄損傷治療剤、頭部外傷治療剤、脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としての薬用人参サポニン分画構成成分のいずれか又はその代謝産物の使用。

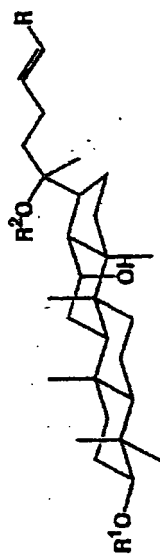
87. 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用医薬組成物を製造するための薬用人参サポニン分画構成成分のいずれかもしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用。

88. 薬用人参に含有される成分をリード化合物として脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を検索する方法。

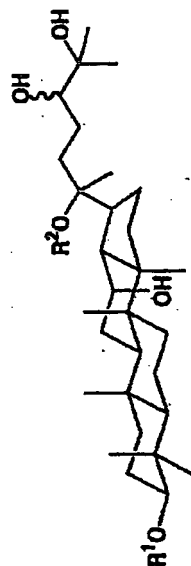
89. 脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を検索するために薬用人参に含有される成分のリード化合物としての使用。



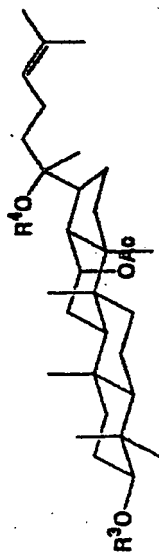
6



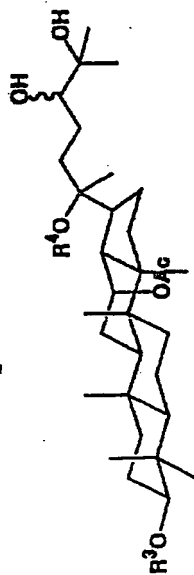
7 R = alkyl, aryl, CO_2H , etc; R = alkyl



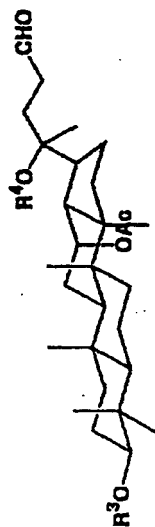
8



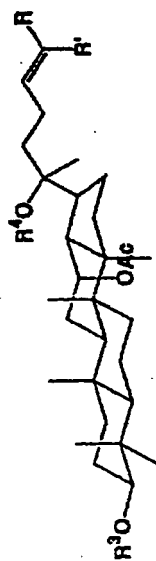
1



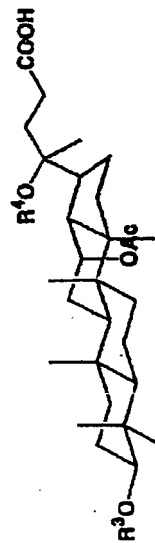
2



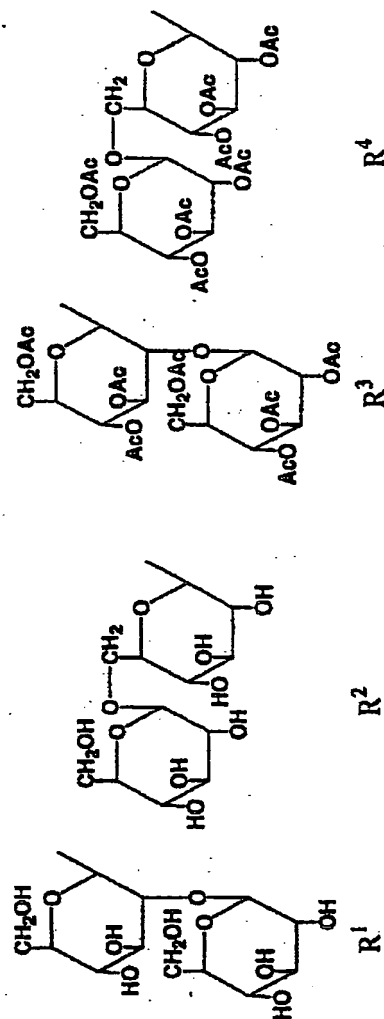
3



4 R = alkyl, aryl, CO_2Et , etc; R = alkyl



5





答 弁 書

特許庁審査官 鶴見 秀紀 殿

1. 国際出願の表示 PCT/JPO0/04102

2. 出願人(代表者)

氏名(名称) 科学技術振興事業団

Japan Science and Technology Corporation

あて名 〒332-0012

日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama

332-0012 JAPAN

国籍 日本国 JAPAN

住所 日本国 JAPAN

3. 代理人

氏 名 (10266) 弁理士 佐伯 憲生

SAEKI Norio



あて名 〒103-0027

日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2,

Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

4. 通知の日付 20.02.01

5. 答弁の内容

(1) 補正について

今回の審査官殿の御指摘に鑑み本日、本件の請求の範囲を同時に提出いたしました
した手続補正書にて補正いたしました。

補正後の請求の範囲第2項は、次の通りです。

「2. (補正後) 患部組織における細胞外液濃度が14.5 ng/ml以下にな

るように調整されている薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、脳細胞、神経細胞、神経幹細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞、線維芽細胞、胆管上皮細胞、脂肪蓄積細胞、リンパ球、白血球、細網細胞、大食細胞もしくは形質細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物。」

補正前の請求の範囲第8項は、削除いたしました。

補正後の請求の範囲第9項は次の通りであります。

「9. 請求の範囲第2項に記載の細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死をきたす疾患の治療、予防、又は処置のための請求の範囲第2項～第5項のいずれかに記載の医薬組成物。」

補正前の請求の範囲第16項は、削除いたしました。

補正後の請求の範囲第17項は、次の通りであります。

「17. (補正後) 薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が $1 \sim 1450 \text{ fg/ml}$ もしくは $1 \sim 145000 \text{ fg/ml}$ である請求の範囲第12項～第15項のいずれかに記載の静脈内投与用製剤。」

補正後の請求の範囲第18項は、次の通りであります。

「18. (補正後) 患部における細胞外液濃度が 14.5 ng/ml 以下になるように調整されている薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物。」

補正前の請求の範囲第22項は、削除いたしました。

補正前の請求の範囲第22項の削除に伴い、補正後の請求の範囲第23項は、次の通りになっております。

「23. (補正後) 薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の濃度が $1 \sim 1450 \text{ fg/ml}$ もしくは $1 \sim 145000 \text{ fg/ml}$ である請求の範囲第18項～第21項に記載の医薬組成物。」

補正前の請求の範囲第26項は、削除いたしました。

補正前の請求の範囲第26項の削除に伴い、補正後の請求の範囲第27項は次の通りになっております。

「27. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、脊髄損傷である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。」

補正前の請求の範囲第26項の削除に伴い、補正後の請求の範囲第28項～第30項では、請求の範囲第26項の引用を削除いたしました。

補正後の請求の範囲第31項は、次の通りであります。

「31. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が神経組織の二次変性である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。」

補正後の請求の範囲第32項は、次の通りであります。

「32. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が神経組織又は脊髄組織の外傷である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。」

補正後の請求の範囲第34項は次の通りであります。

「34. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患がオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死による疾患である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。」

補正後の請求の範囲第36項は、次の通りであります。

「36. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が脱髄である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。」

補正後の請求の範囲第37項は、次の通りであります。

「37. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が脱髄である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。」

「38. (補正後) 脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫をきたす疾患が、脳出血、クモ膜下出血、頭部外傷、脊髄損傷、又は神経外傷である請求の範囲第37項に記載の医薬組成物。」

補正後の請求の範囲第39項は、次の通りであります。

「39. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、脊髄損傷、頭部



外傷又は神経外傷である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。」

補正後の請求の範囲第40項は、次の通りであります。

「40. (補正後) 患部組織における細胞外液濃度が14.5 ng/ml以下になるように調整されている薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心臓疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物。」

補正前の請求の範囲第43項は、削除いたしました。

補正前の請求の範囲第43項の削除に伴い、補正後の請求の範囲第44項は、次の通りとなります。

「44. (補正後) 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなる静脈内投与用製剤。」

補正前の請求の範囲第43項の削除に伴い、補正後の請求の範囲第47項、第49項、第52項では、請求の範囲第43項の引用を削除いたしました。

(2) 見解書の概要

文献及び説明

文献1. Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 32, no. 6, p406-410, 1997

文献2. Korean J. Ginseng Sci., vol. 22, no. 1, p66 - 72, 1998

文献3. Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 17, no. 1, p44 - 48, 1996

文献4. Neuroscience Research vol. 28, p191-200, 1997

文献5. Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 30, no. 9, 1995

文献6. Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 8, no. 1, p7 - 12, 1994

文献7. Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 3, no. 1, p18-21, 1989

文献8. Acta Pharmacologica Sinica, vol. 13, no. 5, p403 - 406, 1992

文献9. Acta Pharmacologica Sinica, vol. 7, no. 3, p222 - 226, 1986

文献10. Clinical and Experimental pharmacology and Physiology, vol. 23,
no. 8. p728 - 732, 1996

文献11. Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 22, no. 1, p1 - 5, 1987



文献12. Chem. Pharm. Bull., vol. 40, no. 2, p314 - 317, 1992

文献13. Chem. Pharm. Bull., vol. 21, no. 13, p2702 - 2711, 1973

文献14. JP, 6 - 316527, A(毛利哲朗)15.11月.1994(15.11.94)

文献15. WO, 90/08315, A(PANG PKT)26.7月.1990(26.07.90)&JP, 4 - 504414, A&US,
4966893, A&EP, 453515, A&US, 5137878, A&DE, 69032201, B&KR, 160104, B

「請求項2 - 5、8 - 12は、文献1、2により新規性を有しない。前記文献には人参サボニンが細胞のアポトーシスを抑制することが記載されている。また、文献1にはそれが神経細胞であることが記載されている。そして、請求項18 - 21は、文献3 - 5、15に記載されている。請求項24、25は、文献3に記載されている。請求項37 - 39は文献6に記載されている。請求項40、42は、文献8、10、11に記載されている。請求項43、47、48は文献3、7に記載されている。請求項49、52は文献9に記載されている。

請求項13 - 17において、文献1の記載に基づいて有効投与量決定することは、当業者によれば自明のことである。請求項22、23において、文献3 - 5、15の記載に基づいて有効投与量を決定することは、当業者によれば自明のことである。文献3 - 5、15には脳や神経の疾病に人参サボニンが有効であることが記載されているので、請求項26 - 28、31 - 33、36に記載された神経や脊髄の損傷に適用し効果を確認することは当業者によれば自明のことである。請求項44 - 46において、文献3、7の記載に基づいて有効量を決定することは、当業者によれば自明のことである。請求項51において、文献3、7、9の記載に基づいて静脈投与製剤を単回あるいは持続投与とすることは、当業者にすれば自明のことである。請求項69 - 72は、文献8の記載に基づいて心筋細胞保護剤に適用すること及び有効量を決定することは当業者によれば自明のことである。請求項81 - 89は、文献1 - 11、15の記載に基づいて、薬用人参の有効成分が特定されればその成分をリード化合物にし、そして同じ薬効の有効成分得ることは、当業者によればさほどの困難性を有せずなし得ることである。」

(3) 出願人は審査官殿の見解には承服しかねますので、以下にその理由を記述

いたします。最初に、参考のために本件発明と文献 1 - 1 5 に開示されている事項の概要をまとめて次の表に示します。

本件発明と文献 1 - 1 5 に開示されている事項の概要のまとめ

文献	細胞外液濃度	投与量	作用の概要
本件	14.5ng/ml以下 14.5ng/ml以下 14.5ng/ml以下	(2.9mg/kg以下) (2.9mg/kg以下) (2.9mg/kg以下)	Bcl-x _L の発現を促進 (1) アポトーシス様細胞死抑止 (2-17) 神経組織又は脊髄組織の損傷 (18-39) 心臓疾患 (40-41, 52) 低濃度の静脈内投与用製剤 (43-51) 生体組織の浮腫 (53-55, 72, 73) 褥創 (56-57, 72, 73) 神経麻痺 (58-59, 72, 73) 排尿・排便障害 (60-61, 72, 73) ジンセノサイド Rb ₁ (62-71, 72, 73) ジヒドロジンセノサイド Rb ₁ (74-80) 有効成分を探索する方法等 (81-89)
1	1~10 µg/ml		培養神経細胞のアポトーシスの抑制
2		40mg/kg	放射線空腸陰窩細胞のアポトーシスの抑制
3		10~40mg/kg	脳虚血ラットに効果
4		10~20mg/kg	遅発性神経細胞死を有意に抑止
5	1 µg/ml		有意な効果無し
6		100mg/kg	脳血流量増加、脳浮腫を軽減
7		100mg/kg	脳波の改善、脳浮腫を軽減
8	20~30 µg/ml		心筋細胞傷害を軽減
9		30mg/kg	心筋虚血再灌流傷害を軽減
10		30mg/kg	心筋虚血再灌流傷害を軽減
11	8.3~250 µg/ml		虚血再灌流傷害を抑止
12			G.Rb ₁ の酵素免疫アッセイ

13			薬用人参の成分分析
14		10～50mg/day	神経細胞賦活物質の製法
15		2～20mg/kg	アルツハイマー型痴呆症の症状改善

(4) 見解書において引用される文献1は $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (約 $1\mu\text{g}/\text{ml}$) 及び $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$) の細胞外液濃度でジンセノサイド Rg₁が培養神経細胞のアポトーシスを有意に抑止することを記載しております。しかし、 $0.1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (約 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) の細胞外液濃度では有意な効果は得られていません。

見解書において引用されている文献2はマウスに個体 (head) あたり薬用人参エキスを1mg非経口的に全身投与すると放射線による空腸陰窩細胞のアポトーシスが抑止されることを示しております。マウスの体重は通常25g前後でありますので、文献2における薬用人参エキスの全身非経口投与量は $40\text{mg}/\text{kg}$ 程度と考えられます。薬用人参エキスの細胞外液濃度、経口投与量については文献2に記載されておられません。文献2には、マウスの飲料水中の薬用人参エキスの濃度が $2\text{mg}/\text{ml}$ とだけ記載されており、マウスの水分摂取量は不明であります。

一方、本件の補正後の請求の範囲第2項の発明は、「患部組織における細胞外液濃度が $14.5\text{ng}/\text{ml}$ 以下になるように調整されている薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物。」であります。また、本件明細書51ページ24行目に、薬用人参粗サポニン分画（広義には薬用人参粗サポニン分画も薬用人参エキスの範疇に含まれます）の全身投与量は $2.9\text{mg}/\text{kg}$ 以下であると記載されております。すなわち全身非経口投与量を $2.9\text{mg}/\text{kg}$ 以下に設定すれば、本発明の医薬組成物の患部組織における細胞外液濃度が $14.5\text{ng}/\text{ml}$ 以下になると本件明細書では考えられております。

また、本発明では神経細胞や空腸陰窩細胞のみならず、その他のあらゆる種類の細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死が低濃度 ($14.5\text{ng}/$

m l 以下) の本発明の医薬組成物により抑止されることが新規に見出されており
ます。

従いまして、文献 1、2 と本発明の医薬組成物を明確に区別するため、補正前
の請求の範囲第 2 項に「患部組織における細胞外液濃度が $1.4 \sim 5 \text{ ng/ml}$ 以
下になるように調整されている」という濃度に関する補正を加えるとともに、
「脳細胞、神経細胞、神経幹細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、
肝細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞、線維芽細胞、胆管上皮細胞、脂肪蓄積細
胞、リンパ球、白血球、細網細胞、大食細胞もしくは形質細胞」という細胞の種
類を特定するための補正をいたしました。さらに、補正後の請求の範囲第 9 項に
も「請求の範囲第 2 項に記載の細胞」という細胞の種類を特定するための補正を
いたしました。これにより、補正後の請求の範囲第 2 項は、新規性を有すると考
えられます。

また、補正後の請求の範囲第 3 ～ 5 項は補正後の請求の範囲第 2 項を引用する
ものでありますので新規性を有するものであります。補正後の請求の範囲第 9 項
ならびに第 10 項は補正後の請求の範囲第 2 項～第 5 項を引用するものでありま
すので新規性を有するものであります。補正後の請求の範囲第 11 項は、補正後
の請求の範囲第 10 項を引用するものでありますので新規性を有するものであり
ます。補正後の請求の範囲第 12 項は補正後の請求の範囲第 2 項～第 11 項を引
用するものでありますので、新規性を有するものであります。

(5) 見解書において引用されている文献 3 は本件明細書にて引用されているも
のでありますが、 10 mg/kg もしくは 40 mg/kg という高用量ジンセノ
サイド R b 1 の単回静脈内投与が脳虚血ラットに効果を示すことを報告していま
す。文献 3 では 40 mg/kg というより高用量のジンセノサイド R b 1 が 10
 mg/kg のジンセノサイド R b 1 よりも優れた効果を発揮することが報告され
ています。

見解書において引用されている文献 4 は、本件明細書にて引用されている本発
明者ら(阪中、田中)の論文であります。文献 4 は、スナネズミに 3 分間もしくは
3.5 分間の一過性前脳虚血を負荷したのちにジンセノサイド R b 1 を脳室内

投与すると遅発性神経細胞死が有意に抑止されることを示しております。また文献4は、3.5分間の一過性前脳虚血を負荷する前にジンセノサイドRb1 (10 mg/kg、20 mg/kg) を腹腔内投与しておきますと遅発性神経細胞死が抑止されますが、3.5分間の一過性前脳虚血を負荷した後にジンセノサイドRb1 (10 mg/kg、20 mg/kg) を腹腔内投与しても効果は認められないと記載されております。すなわち腹腔内投与されたジンセノサイドRb1の神経細胞保護効果は、一過性前脳虚血のような軽症のモデル動物においてもそれほど強くないことが文献4で示されております。なお文献4では0.1~100 fg/mlのジンセノサイドRb1が化学的細胞膜酸化因子であるヒドロキシラジカルによる神経細胞傷害を予防することが培養実験により示されております。

文献5は、10 μ mol/L~100 μ mol/L (約10 μ g~100 μ g/ml) のジンセノサイドRb1もしくはジンセノサイドRg1がグルタミン酸の神経細胞毒性を軽減することを示すものであります。文献5では、1 μ mol/L (約1 μ g/ml) のジンセノサイドRb1ならびにジンセノサイドRg1は有意な効果を示しておりません。

文献6は、100 mg/kg/日の薬用人参粗サポニン分画もしくは薬用人参エキスの虚血前腹腔内投与が、ラット脳虚血再灌流障害モデルにおいて、脳血流量を増加せしめること、Ca²⁺の蓄積を軽減すること、K⁺の消失を軽減すること、ならびに脳浮腫を軽減することを示しております。

文献7は、100 mg/kg/日の薬用人参粗サポニン分画もしくは薬用人参エキスの虚血前静脈内投与が、ラット脳虚血再灌流障害モデルにおいて、脳波を改善すること、脂質過酸化ならびに脳浮腫を抑止することを示しております。

文献15は、ジンセノサイドRb1又はジンセノサイドRg1が体重50 kgのヒトに対して100~1000 mg/日の投与量で、神経細胞からのアセチルコリン遊離を促進することによりアルツハイマー型痴呆症の症状を改善することを開示しています。しかし、本件明細書の引用でも記載されたごとく、文献15は、ジンセノサイドRb1又はジンセノサイドRg1が神経細胞死を抑止するかどうかという課題には言及していません。

以上のごとく、文献3、4、5、6、7、15におきましては、低濃度(14.

5 ng/ml 以下) の薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩が、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物となることはまったく記載されておられません。

文献 3、4、5、6、7、15 と本発明の医薬組成物とを明確に区別するため、補正前の請求の範囲第 18 項に「患部組織における細胞外液濃度が 14.5 ng/ml 以下になるように調整されている」という濃度に関する補正を加えるとともに、「神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患」という脳・神経疾患を特定するための補正をいたしました。この補正に伴い、補正前の請求の範囲第 22 項は削除いたしました。補正前の請求の範囲第 22 項の削除に伴い、補正後の請求の範囲第 23 項では「補正後の請求の範囲第 18 項～第 21 項のいずれか」を引用いたしました。補正前の請求の範囲第 18 項の補正に伴い、補正前の請求の範囲第 26 項も削除いたしました。補正前の請求の範囲第 26 項の削除に伴い、補正後の請求の範囲第 27 項では「補正後の請求の範囲第 18 項～第 25 項のいずれか」を引用するとともに、補正後の請求の範囲第 28 項～第 30 項から請求の範囲第 26 項の引用を削除しました。

また、補正後の請求の範囲第 31 項～第 33 項、第 34 項、第 36 項、第 37 項におきまして、「神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患」という脳・神経疾患を特定するための補正をいたしました。これに伴い、補正後の請求の第 38 項では「脳卒中、脳梗塞」を削除いたしました。さらに、補正後の請求の範囲第 39 項でも、「神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患」という脳・神経疾患を特定するための補正をするとともに、「脳血管性痴呆、脳梗塞、脳卒中又は一過性脳虚血発作」を削除いたしました。

以上の補正により、補正後の請求の範囲第 18 項は新規性を有すると考えられます。補正後の請求の範囲第 19 項～第 21 項は補正後の請求の範囲第 18 項を引用するものでありますので、同じく新規性を有します。補正後の請求の範囲第 24 項は、補正後の請求の範囲第 18 項～第 23 項を引用するものでありますので、新規性を有します。補正後の請求の範囲第 25 項は、補正後の請求の範囲第 24 項を引用するものでありますので、新規性を有します。補正後の請求の範囲

第37項は補正後の請求の範囲第18項～第25項を引用するものでありますので、新規性を有します。補正後の請求の範囲第38項は、補正後の請求の範囲第37項を引用するものでありますので新規性を有します。補正後の請求の範囲第39項は、補正後の請求の範囲第18項～第25項を引用するものでありますので新規性を有します。

(6) 見解書において引用されている文献8は、培養心筋細胞に対するジンセノサイドRb₁、ジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃の作用を示すものでありますが、文献8の表1ではジンセノサイドRb₁ 5 μ g/mlの効果は明らかにジンセノサイドRb₁ 20 μ g/mlの効果より軽微であることが明記されております。この実験結果を受けて、文献8では表1に示すごとく、ジンセノサイドRb₁、ジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃の効果を20 μ g/mlという高濃度に限定して実験が実施されております。さらに、表2におきましても30 μ g/mlという高濃度のジンセノサイドRb₁、ジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃が、キサンチン-キサンチン酸化酵素による心筋細胞傷害を軽減することが記載されております。

また、見解書において引用されている文献9、10、11は、Chen Xi uらの一連の研究成果であります。文献9は心筋虚血再灌流傷害に対して、30 mg/kgの用量の薬用人参粗サポニン分画又は薬用人参エキスの静脈内投与が、プロスタグランディンI₂ (PGI₂) / トロンボキサンA₂ (TXA₂) 系に好影響を与えることにより、保護効果を発揮することを心筋逸脱酵素CPKを指標にして明らかにしています。文献10も文献9を引用することにより、同様の効果を再度記載したものであります。文献11は、ジンセノサイドRb類とジンセノサイドRoの混合物が8.3 μ g/mlという高濃度で、培養心筋細胞の低酸素/再酸素化傷害(すなわち*in vitro*における虚血再灌流傷害)を抑止することを心筋逸脱酵素CPKを指標にして明らかにしております。83 μ g/mlという高濃度の薬用人参粗サポニン分画もしくは薬用人参も同様の作用を有することが文献11に記載されております。

以上の文献9、10、11をまとめますと、30 mg/kgの薬用人参粗サポ

ニン分画を心筋虚血再灌流損傷を負荷する前に静脈内投与しておけば、患部組織における薬用人蔘粗サポニン分画の濃度が $83\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度となり、心筋細胞が虚血再灌流傷害から保護されると考えられます。

一方、本発明では $2.9\text{mg}/\text{kg}$ 以下の薬用人蔘粗サポニン分画を静脈内投与すれば患部組織における薬用人蔘粗サポニン分画の細胞外液濃度が $14.5\text{ng}/\text{ml}$ 以下となるものと考えられております（本件明細書51ページ24行）。

従いまして、文献9、10、11と本件明細書の医薬組成物を明確に区別するために、補正前の請求の範囲第40項に「患部組織における細胞外液濃度が $14.5\text{ng}/\text{ml}$ 以下になるように調整されている」という濃度に関する補正を加えました。これにより、補正後の請求の範囲第40項は新規性を有するものと考えられます。

補正後の請求の範囲第42項は、補正後の請求の範囲第5項又は第21項を引用するものでありますので新規性を有します。

(7) 文献3、7、9と本件発明の静脈内投与製剤を明確に区別するため補正前の請求の範囲第43項は削除いたしました。補正前の請求の範囲第43項の削除に伴い、補正後の請求の範囲第44項、第47項、第49項、第51項、第52項から、補正前の請求の範囲第43項の引用を削除いたしました。その結果補正後の請求の範囲第47項は、補正後の請求の範囲第44項～第46項を引用するものでありますので新規性を有します。補正後の請求の範囲第48項は、補正後の請求の範囲第47項を引用するものでありますので新規性を有します。補正後の請求の範囲第49項は、補正後の請求の範囲第44項～第46項を引用するものでありますので新規性を有します。補正後の請求の範囲第52項は、補正後の請求の範囲第44項～第51項を引用するものでありますので新規性を有します。

(8) 補正後の請求の範囲第2項は、文献1、2より当業者が想到することは困難と考えられますので以下にその理由を記述いたします。

文献1におきましては、 $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （約 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）及び $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）のジンセノサイドRg1が神経細胞のアポトーシ

スを抑止することが記載されておりますが、文献1の表1、表2、表3、のデータを見る限り、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ のジンセノサイドRg1は $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ のジンセノサイドRg1よりも優れた効果を示しております。しかも、 $0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （約 $100\ \text{ng}/\text{ml}$ ）のジンセノサイドRg1は有意な効果を示しておりません。従いまして $0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下の濃度で薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩が、神経細胞のアポトーシスを抑止するなどということは、当業者として想到することは極めて困難であります。すなわち補正後の請求の範囲第2項に記載の「患部組織における細胞外液濃度が $14.5\ \text{ng}/\text{ml}$ 以下に調整されている」という濃度に関する事項は、文献1の実験データから判断する限り、当業者はまったく想到することができないと考えられます。

文献2は、薬用人参エキスの腹腔内投与もしくは経口投与が放射線に暴露された空腸陰窩細胞のアポトーシスを抑止することを示しておりますが、薬用人参エキスの患部組織における細胞外液濃度は記載されております。一方本件明細書では、薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩が、脳・神経組織、肝臓、脾臓における抗アポトーシス因子Bcl-xLの発現を促進するという分子機構解析がなされております。その分子機構解析結果に基づいて、本発明の医薬組成物が脳細胞、神経細胞、神経幹細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞、線維芽細胞、胆管上皮細胞、脂肪蓄積細胞、リンパ球、白血球、細網細胞、大食細胞もしくは形質細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止することが、補正後の請求の範囲第2項に記載されております。このように多種多様な細胞に対して、患部組織における細胞外液濃度が $14.5\ \text{ng}/\text{ml}$ 以下になるように調整されている本発明の医薬組成物が抗アポトーシス作用を発揮するなどということは、Bcl-xL発現解析を実施した本発明においてのみ想到できることであり、作用機構もしくは分子機構の解析がなされていない文献2からは当業者は想到できないと考えられます。

以上の理由より、補正後の請求の範囲第2項は、進歩性を有すると考えられます。補正後の請求の範囲第3項～5項は、補正後の請求の範囲第2項を引用する

ものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第9項、第10項は、補正後の請求の範囲第2項～第5項を引用するものでありますので、進歩性を有します。補正後の請求の範囲第11項は、補正後の請求の範囲第10項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第12項は、補正後の請求の範囲第2項～第11項を引用するものでありますので進歩性を有します。

(9) 請求の範囲第13項～第17項において、文献1の記載に基づいて有効投与量を決定することは、当業者によれば自明のことであるという審査官殿の見解には、本出願人は承服しかねますので以下にその理由を述べます。薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の中でも、もっとも経口投与量が多いと考えられるのが薬用人蔘すなわちコウジン末であります。しかし、そのコウジン末ですら体重60kg程度の成人1日あたりの経口投与量の上限は6g程度、好ましくは4.5g程度とされております。日本においても健保適用が認められるコウジン末の1日経口投与量は成人(体重60kg)あたり4.5g以下であります。この経口投与量は長年にわたるコウジン末の服用経験から見出されたものであります。当業者も研究者もこのような経験的に割り出されたコウジン末の経口投与量をもとに、薬用人蔘エキス、薬用人蔘粗サポニン分画、薬用人蔘成分又はジンセノサイド類を用いた *in vivo* もしくは *in vitro* の実験を実施してきたわけであります。言い換えますと、薬用人蔘研究に関しましては数千年にも及ぶ歴史的経験から経口投与量が前提としてほぼ決められていたわけであります。一方、文献1のジンセノサイド Rg1を用いた培養実験結果から経口投与量を割り出すということは、経口投与された薬用人蔘もしくはその成分の体内動態が明らかにされていない現状では、当業者といえども極めて困難であると言わざるを得ません。ただ、非経口投与量は文献1より10mg/kg程度であることがおよそ推測されます。事実、本件明細書におきましても、実際にこれまでに報告されたことがない高用量のコウジン末の経口投与が、神経組織の Bcl-x_L発現を促進し、神経細胞又は脳細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止することが明らかにされたわけであります。それと同時に患部組織における薬用人蔘もしくはそのエキ

ス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の細胞外液濃度が文献1に記載されたジンセノサイドRg₁の細胞外液濃度（ $1\mu\text{M}/\text{L}$ ・ $10\mu\text{M}/\text{L}$ ）よりもかなり低いこと（すなわち $14.5\text{ng}/\text{ml}$ 以下であること）が見出されたわけであります。すなわち、アポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死をきたす脳・神経疾患におきまして、薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を請求の範囲第13項に記載のごとく、従来考えられていた以上に高用量で経口投与すれば、請求の範囲第16項及び第17項に記載のごとく文献1に開示された濃度よりもかなり低い細胞外液濃度が脳神経組織で維持され、その結果アポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死をきたす脳・神経疾患の予防、処置、治療に有用となることが、本発明において見出されたわけであります。このように本発明の医薬組成物の患部組織における細胞外液濃度は従来考えられていたものよりかなり低いにもかかわらず、経口投与量は歴史的経験より割り出されたものよりも多いということは、当業者が想到することはまずもって困難な事項であると考えられます。

また、文献1におきましては、 $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （約 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）及び $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）のジンセノサイドRg₁が神経細胞のアポトーシスを抑止することが記載されておりますが、文献1の表1、表2、表3のデータを見る限り、 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ のジンセノサイドRg₁は $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ のジンセノサイドRg₁よりも優れた効果を示しております。しかも、 $0.1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （約 $100\text{ng}/\text{ml}$ ）のジンセノサイドRg₁は有意な効果を示しておりません。従いまして $0.1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下の濃度で薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩が、神経細胞のアポトーシスを抑止するなどということは、当業者として想到することは極めて困難であります。すなわち請求の範囲第16項ならびに第17項に記載の患部組織における細胞外液濃度は、文献1の実験データから判断する限り、当業者はまったく想到することができないと考えられます。さらに、請求の範囲第14項及び第15項に記載の医薬組成物を含有してなる静脈内投与製剤も、請求の範囲第16項ならびに第17項に記載の細胞外液濃度をもとにして本発明者が想到したものでありますので、当業者が想到することは困難な事項であります。

以上の理由から、請求の範囲第13項～第17項は進歩性を有するものと考えられます。

(10) 補正後の請求の範囲第18項は、文献3-5、15より当業者が想到することは困難であると考えられますので、以下にその理由を記述いたします。

文献3におきまして、 10 mg/kg 及び 40 mg/kg の用量のジンセノサイドRb₁を静脈内投与しますと、ラット脳の中大脳動脈の虚血再灌流傷害が軽減されることが記載されておりますが、文献3の表1、2、3のデータを見る限り、明らかに 40 mg/kg の用量のジンセノサイドRb₁の方が優れた効果を示しており、 10 mg/kg の用量のジンセノサイドRb₁の効果は軽微であると考えられます。しかも、ラットの中大脳動脈永久閉塞モデルにおきましては、中大脳動脈を永久閉塞する前に 10 mg/kg の用量のジンセノサイドRb₁を静脈内投与しておいても有意な効果が認められず、 40 mg/kg の用量のジンセノサイドRb₁を中大脳動脈永久閉塞前に静脈内投与したときのみ軽微ながらも有意な効果が認められております。以上のことより、 10 mg/kg 以下の用量のジンセノサイドRb₁を静脈内投与しても脳・神経疾患に対して優れた効果が得られるとは当業者は想到できないものと思われれます。

一方、本件明細書51ページ24行目には、薬用人蔘粗サポニン分画を 2.9 mg/kg 以下の用量で静脈内投与すれば、患部組織における当該医薬組成物の細胞外液濃度が 14.5 ng/ml 以下に維持され、脳・神経疾患特には神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防・処置又は治療に有用となることが見出されております。すなわち、本発明では、文献3から当業者が想到できないくらい低用量・低濃度の前記医薬組成物が、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患に優れた効果を発揮することが見出されたわけであります。しかも、文献3に記載されたジンセノサイドRb₁の軽微な脳虚血病変改善作用からは当業者が想到することができない程、低用量、低濃度の本発明の医薬組成物は実施例9、10、11に示すごとく、寝たきりの脊髄損傷ラットを起立せしめるという歴史上かつてない効果、効能を発揮したわけであります。従って、補正後の請求の範囲第18項を、文献3の情報から当業者が想到することはまずもって不可能と考えられ

ます。

本発明者ら（阪中、田中）の研究論文であります文献4におきましては、スナネズミの3.5分間の一過性前脳虚血モデルに対して、ジンセノサイドRb₁（10mg/kg、20mg/kg）の虚血前腹腔内投与が有意に海馬CA1領域の遅発性神経細胞死を抑止することが記載されております。しかしながら虚血後の腹腔内投与ではまったく効果は認められないと文献4には記載されております。スナネズミの3.5分間の一過性前脳虚血モデルはヒトの一過性脳虚血発作に相当する非常に軽症なモデルですので、このような軽症の脳虚血モデルに対して、ジンセノサイドRb₁が治療効果を示さないという実験事実から判断しますと、当業者はジンセノサイドRb₁もしくは薬用人蔘粗サポニン分画がはるかに重篤な脊髄損傷モデルに対して著効を示し寝たきりの脊髄損傷ラットを起立せしめるという治療効果を発揮するとは到底想像もできないのであります。

しかも、スナネズミの3.5分間の一過性前脳虚血モデルでは、海馬CA1神経細胞がフリーラジカル、グルタミン酸、カルシウム等の化学的傷害因子に暴露されて遅発性神経細胞死に陥るわけでありますが、補正後の請求の範囲第18項に記載の「神経組織又は脊髄組織の傷害による疾患」は通常当該組織が機械的・物理的因子によって傷害を受けるものであります。従いまして、一過性前脳虚血発作において化学的傷害因子による遅発性神経細胞死がジンセノサイドRb₁により予防されたからと言って、ジンセノサイドRb₁又は薬用人蔘粗サポニン分画が機械的・物理的因子による神経外傷、脊髄損傷、頭部外傷に対して歴史上かつてないほど優れた効果を示し寝たきりの脊髄損傷ラットを起立せしめるという治療効果を発揮するなどということは当業者は到底想像できないと思われます。すなわち、ジンセノサイドRb₁の中枢作用に関して文献3、4で記載された事項は、*in vitro*のみならず*in vivo*の実験結果を網羅しておりますので、このこと、特にジンセノサイドRb₁の*in vivo*における遅発性神経細胞死抑止効果が軽微であるということ、がかえって当業者としてジンセノサイドRb₁を「神経組織又は脊髄組織の傷害による疾患」の予防、治療、処置のために利用することは困難であると想到せしめるものと考えられます。もちろん、文献4の著者である本発明者ら（阪中、田中）も、*in vivo*でそれ



ほど優れた効果を示さないジンセノサイドRb₁がかくもあざやかに寝たきりの脊髄損傷ラットを起立せしめるなどということは夢想だにできなかったわけであります。

一般に神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患（たとえば脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷など）は、その発症を予測することはまずもって不可能でありますので、神経組織や脊髄組織の損傷又は外傷が起きた後に、治療を開始するというのが常であります。従いまして、文献4に記載のごとく軽症の遅発性神経細胞死すら腹腔内投与により治療する効果を示さないジンセノサイドRb₁をもってして、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患（たとえば脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷など）を治療できるとは当業者には考えられないのであります。まお、文献4は、ジンセノサイドRb₁の脳室内投与が軽症の遅発性神経細胞死を治療することができることを記載しておりますが、実際に神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患（たとえば脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷など）を有する患者を治療する際には、医薬組成物を脳室内注入するなどということは、手技上の困難さと治療上のリスクに配慮して、ほとんどなされませんので、当業者はジンセノサイドRb₁の脳室内投与の効果を確認したとしても、その腹腔内投与の効果の甘さ（悪さ）に鑑みて、ジンセノサイドRb₁を神経組織又は脊髄組織の傷害による疾患に応用できるとはまずもって考えないのであります。ちなみに、軽症の遅発性神経細胞死を腹腔内投与により治療することができる化合物はグルタミン酸拮抗薬を含めて多々ありますが、そのいずれも*in vivo*（生体）においては、脊髄損傷ラットを起立せしめるなどという優れた効果を示しておりません。従って、補正後の請求の範囲第18項を、文献4の情報から当業者が想到することは困難であると言えます。

文献5は、ジンセノサイドRb₁又はジンセノサイドRg₁が $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）もしくは $100\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （約 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の細胞外液濃度でグルタミン酸の神経毒性を軽減することを示しておりますが $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （約 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）のジンセノサイドRb₁又はジンセノサイドRg₁は文献5の表1をみる限り、有意な効果を示しておりません。しかも、文献5の図1、表1、表2を見る限り、ジンセノサイドRb₁又はジンセノサイド

Rg₁がグルタミン酸の神経毒性を軽減するための至適細胞外液濃度は当業者によれば10 μM（約10 μg/ml）と考えられます。それよりも濃度を低くすれば明らかに効果が低くなりますので、文献5のデータを見る限り、細胞外液濃度が0.1 μM（約100 ng/ml）以下ではあまり効果が認められなると当業者は考えます。

従いまして、補正後の請求の範囲第18項における「患部組織における細胞外液濃度が14.5 ng/ml以下になるように調整されている」という濃度に関する記載は、文献5から当業者は想到することが困難なものであります。また、文献5は、グルタミン酸という化学的因子による神経細胞の傷害が高濃度のジンセノサイドRb₁又はジンセノサイドRg₁により軽減されることを示したものでありますが、やはりより低濃度のジンセノサイドRb₁又はジンセノサイドRg₁が物理的・機械的因子による脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷に効果を発揮するなどということは当業者が想到することはできないものであります。

文献15では、ジンセノサイドRb₁又はジンセノサイドRg₁がアセチルコリン含有神経細胞からのアセチルコリン遊離を促進することによりアルツハイマー型痴呆症の症状を改善することが開示されておりますが、ジンセノサイドRb₁又はジンセノサイドRg₁が神経細胞死を抑止するか否かもしくは神経細胞保護作用を示すかどうかということについてはまったく開示されておられません。しかも、文献15は、ジンセノサイドRb₁又はジンセノサイドRg₁がアセチルコリン含有神経細胞からのアセチルコリン遊離を促進することをメカニズムとしてあげておりますので、本メカニズムからもジンセノサイドRb₁又はジンセノサイドRg₁が、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患に有用であることは当業者には考えられないと言えます。

従いまして、補正後の請求の範囲第18項を、文献15の情報から当業者が想到することは困難であると言えます。

以上のことより、補正後の請求の範囲第18項は、文献3-5、15より当業者が想到することは困難な事項でありますので、進歩性を有すると考えられます。補正後の請求の範囲第19項～第21項は、補正後の請求の範囲第18項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第23項は、補

正後の請求の範囲第18項～第21項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第24項は、補正後の請求の範囲第18項～第23項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第25項は、補正後の請求の範囲第24項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第27項は、補正後の請求の範囲第18項～第25項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第28項は、補正後の請求の範囲第27項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第31項及び第32項は、補正後の請求の範囲第18項～第25項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第33項は補正後の請求の範囲第32項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第36項及び第37項は、補正後の請求の範囲第18項～第25項を引用するものでありますので、進歩性を有します。補正後の請求の範囲第38項は、補正後の請求の範囲第37項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第39項は、補正後の請求の範囲第18項～第25項を引用するものでありますので進歩性を有します。

(11) 補正後の請求の範囲第40項は、文献8、9、10、11の情報から当業者が想到することが困難と考えられますので以下にその理由を記述いたします。

見解書において引用されている文献8は、培養心筋細胞に対するジンセノサイドRb₁、Rb₂、Rb₃の作用を示すものでありますが、文献8の表1ではジンセノサイドRb₁ 5 μ g/mlの効果は明らかにジンセノサイドRb₁ 20 μ g/mlの効果より軽微であることが明記されております。この実験結果を受けて、文献8では表1に示すごとく、ジンセノサイドRb₁、ジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃の効果は20 μ g/mlという高濃度に限定して実験が実施されております。さらに、表2におきましても30 μ g/mlという高濃度のジンセノサイドRb₁、ジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃がキサンチン-キサンチン酸化酵素による心筋細胞傷害を軽減することが記載されております。

また、見解書において引用されている文献9、10、11は、Chen Xi

うらの一連の研究成果であります。文献 9 は心筋虚血再灌流傷害に対して、 30 mg/kg の用量の薬用人参粗サポニン分画又は薬用人参エキスの静脈内投与が、プロスタグランディン I_2 (PGI_2) / トロンボキサン A_2 (TXA_2) 系に好影響を与えることにより、保護効果を発揮することを心筋逸脱酵素 CPK を指標にして明らかにしています。文献 10 も文献 9 を引用することにより、同様の効果を再度記載したものであります。文献 11 は、ジンセノサイド Rb_1 、 Rb_2 及び Rb_3 とジンセノサイド Ro の混合物が $8.3 \mu\text{g/ml}$ という高濃度で、培養心筋細胞の低酸素/再酸素化傷害（すなわち虚血再灌流傷害）を抑止することを心筋逸脱酵素 CPK を指標にして明らかにしております。 $83 \mu\text{g/ml}$ という高濃度の薬用人参粗サポニン分画もしくは薬用人参も同様の作用を有することが文献 11 に記載されております。

以上の文献 9、10、11 をまとめますと 30 mg/kg の薬用人参粗サポニン分画を心筋虚血再灌流傷害を負荷する前に静脈内投与しておけば、患部組織における薬用人参粗サポニン分画の濃度が $83 \mu\text{g/ml}$ 程度となり、心筋細胞が虚血再灌流傷害から保護されと考えられます。このように、文献 8、9、10、11 の記載から当業者は本発明の医薬組成物が数 $\mu\text{g/ml}$ 以上の細胞外液濃度で心筋細胞に好ましい効果を発揮するものと考えます。

一方、本発明では 2.9 mg/kg 以下の薬用人参粗サポニン分画を静脈内投与すれば、患部組織における薬用人参粗サポニン分画の細胞外液濃度が 14.5 ng/ml 以下となり優れた効果を示すものと考えられております（本件明細書 51 ページ 24 行目）。

このような低用量・低濃度の本発明の医薬組成物が心臓疾患に有用であるという事は、本件明細書の実施例 10、15、16 からのみ想到できることであり、文献 8、9、10、11 から当業者が想到することは困難であります。

従いまして、補正後の請求の範囲第 40 項は進歩性を有すると考えられます。

(12) 補正後の請求の範囲第 42 項は、補正後の請求の範囲第 5 項又は第 21 項を引用するものでありますので進歩性を有します。

(13) 補正後の請求の範囲第44項～第46項は、文献3、7より当業者が想到することは困難と考えられますので、以下にその理由を記述いたします。

文献3におきまして、 10 mg/kg 及び 40 mg/kg の用量のジンセノサイドRb₁を静脈内投与しますと、ラットの中大脳動脈の虚血再灌流傷害が軽減されることが記載されておりますが、文献3の表1、2、3のデータを見る限り明らかに 40 mg/kg の用量のジンセノサイドRb₁の方が優れた効果を示しており、 10 mg/kg の用量のジンセノサイドRb₁の効果は軽微であると考えられます。しかも、ラットの中大脳動脈永久閉塞モデルにおきましては、中大脳動脈を永久閉塞する前に 10 mg/kg の用量のジンセノサイドRb₁を静脈内投与しておいても有意な効果が認められず、 40 mg/kg の用量のジンセノサイドRb₁を中大脳動脈永久閉塞前に静脈内投与したときのみ軽微ながらも有意な効果が認められております。以上のことより、 10 mg/kg 以下の用量のジンセノサイドRb₁を静脈内投与しても脳・神経疾患に対して優れた効果が得られるとは当業者は考えないものと思われます。

一方、本件明細書におきましては体重 300 g 程度のラットに対して $60\text{ }\mu\text{g}$ /日、 $12\text{ }\mu\text{g}$ /日又は $6\text{ }\mu\text{g}$ /日の用量（すなわち $20\text{ }\mu\text{g/kg}$ の用量）でジンセノサイドRb₁をMCA永久閉塞後もしくは脊髄損傷発症後に静脈内へ持続投与すれば、歴史上かつてない優れた効果（すなわち脳梗塞病巣がコントロールの3分の1から4分の1程度に縮小し、寝たきりの脊髄損傷ラットが起立するという効果）が得られることを明らかにしております。また、 $200\text{ }\mu\text{g/kg}$ 、 $40\text{ }\mu\text{g/kg}$ 、 $20\text{ }\mu\text{g/kg}$ という低用量のジンセノサイドRb₁を静脈内投与すれば患部組織におけるジンセノサイドRb₁の細胞外液濃度が 1 ng/ml 以下となり優れた効果が得られると本件明細書には記述されております。このような、低用量・低濃度のジンセノサイドRb₁からなる静脈内投与用製剤の効果を、文献3から当業者が想到することは困難であります。

文献7は 100 mg/kg のジンセノサイド類（ginsenosides、すなわち薬用人参粗サポニン分画）を体重 300 g 程度のラットに脳虚血再灌流の30分前に投与しておけば、脳虚血再灌流傷害が軽減されるということを記載しております。文献7の著者でありますChen Xiuは心臓関連の文献9、

10、11と同一であります。文献9、10におきましてChen Xiuは心筋虚血再灌流障害に対して30mg/kgの薬用人参粗サポニン分画(ginsenosides)の静脈内投与が効果を発揮することを報告しておりますが、薬用人参粗サポニン分画が心筋虚血再灌流傷害を抑止するためのin vitroの至適濃度は83μg/mlであると文献11に記述されております。残念ながら前記した文献7、9、10、11におきましては、その他の用量・濃度の薬用人参粗サポニン分画を用いた実験の結果がほとんど開示されておられませんので、当業者が薬用人参粗サポニン分画(ginsenosides)の静脈内投与量の幅を文献7、9、10、11から想到することは極めて困難でありますし、よしんば投与量の幅を考えたとしても、過去の高用量・高濃度の薬用人参粗サポニン分画(ginsenosides)を用いた実験結果から投与量を増加せしめることをまず考えるはずであります。しかしながら、敢えて、文献7、9、10、11に記載の情報から薬用人参粗サポニン分画(ginsenoside s)の細胞外液濃度の幅を推測するとすれば、文献11が参考になると思われます。文献11では、方法と結果の一、の(一)におきまして、薬用人参の粗サポニン分画(ginsenosides)の細胞外液濃度が33μg/mlのときよりも83μg/mlのときの方が培養心筋細胞の拍動が効率よく抑制され心筋細胞のエネルギー消費量も節約されることにより、おそらく虚血再灌流傷害も軽減されるだろうという実験結果が示されております。これを受けてその後の低酸素/再酸素化実験(虚血/再灌流実験モデル)では、83μg/mlの濃度の薬用人参粗サポニン分画を用いた実験結果が記載されております。文献11の情報から当業者は、心筋細胞の虚血再灌流傷害を抑止するための薬用人参粗サポニン分画の至適細胞外液濃度は83μg/ml前後であり、その濃度を下げることにより薬用人参粗サポニン分画の虚血再灌流傷害抑止効果は弱くなると判断するはずであります。もっとも文献11では250μg/mlというやや高濃度の薬用人参粗サポニン分画(ginsenosides)は必ずしも心筋細胞の虚血再灌流傷害に対して好ましい効果をもたらさないことが示されております。してみると、薬用人参粗サポニン分画が心筋細胞の虚血再灌流傷害を抑止するための細胞外液濃度域(ならびに静脈内投与用量域)は文献11の情報から判断する限り、

かなり狭いということになります。おそらく、このような理由から文献7、9、10では薬用人蔘粗サポニン分画（ginsenosides）の静脈内投与量は、心筋虚血再灌流傷害に対しては30mg/kg、脳虚血再灌流傷害に対しては100mg/kgという単一の用量に設定されていたものと思われます。また、文献9、10の情報より、当業者は30mg/kgの薬用人蔘粗サポニン分画を静脈内投与することにより、心筋細胞の細胞外液濃度が87μg/ml前後になり、虚血再灌流傷害が軽減されると考えるものと思われます。このような情報や基礎実験結果に基づいて、文献7では文献9、10、11と同一の著者（Chen Xiu）が脳虚血再灌流傷害に対して、心筋虚血再灌流に対して用いた時の用量よりもさらに高い用量で（100mg/kg）薬用人蔘粗サポニン分画（ginsenosides）を静脈内投与したわけであります。このような一連の研究論文から、脳や心筋の虚血再灌流傷害に対する薬用人蔘粗サポニン分画の至適静脈内投与量は30mg/kg～100mg/kgであると当業者は判断するものと考えられます。従いまして、補正後の請求の範囲第44項～第46項に記載のごとく、本発明の医薬組成物の細胞外液濃度が1ng/ml以下となるように調整されている低用量・低濃度の静脈内投与製剤が優れた脳神経疾患・心疾患治療効果を発揮するなどということは、文献7、9、10、11という一連の研究成果から、当業者が想到することは困難であります。さらに、文献3におきましてもジンセノサイドRb₁の至適静脈内投与用量域も40mg/kg前後でありそれほど広がらないと考えられます。ちなみにジンセノサイドRb₁静脈内投与のLD50は500mg/kg程度ですので、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与量の上限を250mg/kgと当業者は推測すると思われます。以上のように文献3から判断しましても前記したごとく、当業者は請求の範囲第44項～第46項に記載の低用量・低濃度のジンセノサイドRb₁からなる静脈内投与用製剤を想到することは困難であります。

なお、文献3に記載の静脈内投与用製剤と本発明の静脈内投与用製剤とは用量・効果とも異なるものであることを本件明細書第6頁15行目～第9頁22行目にも記述しております。特に本発明では、低用量のジンセノサイドRb₁又は薬用人蔘粗サポニン分画を静脈内へ持続投与すれば、高用量の前記医薬組成物を単

回静脈内投与するよりも優れた効果を示すことを始めて明らかにしたものでありますが、低用量・持続投与という請求の範囲第51項に記載の方法は前記したごとく文献3、7、9から当業者が想到することは困難な事項であります。

以上のことより、補正後の請求の範囲第44項～第46項は、当業者が想到することが困難な事項でありますので、進歩性を有します。補正後の請求の範囲第47項は、補正後の請求の範囲第44項～第46項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第48項は、補正後の請求の範囲第47項を引用するものでありますので進歩性を有します。補正後の請求の範囲第49項は、補正後の請求の範囲第44項～第46項を引用するものでありますので、進歩性を有します。補正後の請求の範囲第51項は、補正後の請求の範囲第44項～第50項を引用するものでありますので、進歩性を有します。補正後の請求の範囲第52項は、補正後の請求の範囲第44項～第51項を引用するものでありますので、進歩性を有します。

(14) 補正後の請求の請求の範囲第69項～第73項は、文献8の情報から当業者が想到することは困難と考えられますので、以下にその理由を記述いたします。見解書において引用されている文献8は、培養心筋細胞に対するジンセノサイドRb₁、ジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃の作用を示すものでありますが、文献8の表1ではジンセノサイドRb₁ 5 μ g/mlの効果は明らかにジンセノサイドRb₁ 20 μ g/mlの効果より軽微であることが明記されております。この実験結果を受けて、文献8では、表1に示すごとく、ジンセノサイドRb₁、ジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃の効果を20 μ g/mlという高濃度に限定して実験が実施されております。さらに、表2におきましても30 μ g/mlという高濃度のジンセノサイドRb₁、ジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃がキサンチン-キサンチン酸化酵素による心筋細胞傷害を軽減することが記載されております。このように文献8の表1では、5 μ g/mlのジンセノサイドRb₁はコントロールと比べてほとんど大差のない実験値を示しておりますので、当業者は文献8よりジンセノサイドRb₁は5 μ g/ml前後もしくはそれ以上の細胞外液濃度域で心筋細胞に好ましい効果を及ぼ

すと考えます。また、 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のジンセノサイドRb₂又はジンセノサイドRb₃も表1の数値を見る限り、 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のジンセノサイドRb₁と近似した実験値を示しております。さらに、表3でも、 $30\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のジンセノサイドRb₁、ジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃はそれぞれ近似した実験値を示しておりますので、これらの結果より、当業者はジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃も $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 前後もしくはそれ以上の細胞外液濃度域で心筋細胞に好ましい効果を及ぼすと判断するのが常であります。総じて、ジンセノサイドRb₁はジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃よりも心筋細胞に与える効果は大きいと文献8には記載されておりますので、このことから判断しましてもジンセノサイドRb₁が $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 前後もしくはそれより高い濃度域で心筋細胞に好ましい効果を及ぼすのであれば、ジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃が心筋細胞に影響を与える濃度の下限も $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 前後もしくはそれ以上と当業者は考えます。

一方、本件明細書では、実施例15ならびに実施例16において、ジンセノサイドRb₁が $1\text{ ng}/\text{ml}$ 以下の細胞外液濃度域で、心筋細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死を抑止し、Bcl-x_Lの発現を促進することが見出されております。すなわち、本件明細書におきまして、ジンセノサイドRb₁が思いもかけず、文献8からは当業者が想到することが困難な程低濃度域で、優れた心筋細胞保護作用を示すことが発明されたわけであります。

以上、請求の範囲第69項～第73項は、低濃度のジンセノサイドRb₁に関しまして文献8から想到することが困難な事項を奏するものでありますので、進歩性を有します。

(15) 請求の範囲第81項～第89項は、文献1-11、15の記載から当業者が想到することが困難な事項であると本出願人は考えておりますので、以下にその理由を記述いたします。

ある特定の化合物がリード化合物として認められるためには、少なくとも当該化合物が医薬組成物として卓越した効果・効能と高い臨床応用（実用化）の可能性を秘めたものであることが必要であります。単に通常の *in vitro* もし

くは *in vivo* の薬理実験において、何らかの月並みな薬理作用が当該化合物に見出されたというだけでは、当業者はそれをリード化合物として利用することはあり得ません。また、一定の高品質・高純度の当該化合物が常時大量に入手（精製）可能かもしくは合成可能でなければ、多数の患者に投与することはできませんのでそのような困難な事項が予想される場合も当該化合物をリード化合物として利用するなどということは通常当業者は考えないものであります。さらに、当該化合物が天然物由来でありかつ合成不可能な場合には、医薬組成物として大量に一定の高品質・高純度の原末バルク（原体）を確保することは通常困難を極めることが予想されますので、やはり当該化合物をリード化合物として位置付けるなどということは当業者は想到いたしません。むしろ、一定の高品質・高純度の原末バルク（原体）を大量確保することが困難と判断しただけで、当該化合物はもはや当業者にはリード化合物として認められなくなるのであります。このことをもう少し詳しく述べますと、高純度の化合物（たとえば純度 99.9% 以上）を医薬組成物として開発するときは、前臨床試験や臨床治験において、不純物の毒性試験を省略できる場合がありますが、合成不可能な天然物由来化合物の場合、高純度の当該化合物を安定的に大量精製する見通しが立たなければやはり将来の毒性試験での障害や開発手順の不透明性に配慮して、当該化合物によほど卓越した効果、効能、用途が見出されない限り、当業者は当該化合物をリード化合物として想到しないのであります。さらに、当該化合物をリード化合物として利用する際に、経済的観点からみて採算が合うかどうかもありリード化合物を選択する上で重要な判断基準となります。このようにリード化合物としての基準は単一ではなく、複雑な臨床治験システム、新薬開発手順及び経済性に依存して変化するものであると言えます。

さて、請求の範囲第 81 項～89 項の進歩性に影響を与えると審査官殿が見解書にて指摘されました文献 1-11、15 のうち、単一の化合物を扱っておりますのは、文献 1、3、4、5、8、15 でありますので、前記のリード化合物としての基準に照らし合わせながら、文献 1、3、4、5、8、15 に記載の化合物がリード化合物として当業者に想到されるか否かを以下に述べることにいたします。

文献1はジンセノサイドR_{g1}が $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）前後の至適細胞外液濃度において神経細胞のアポトーシスを抑止することを示しておりますが、当業者はジンセノサイドR_{g1}の全身投与により脳・神経組織における当該化合物の細胞外液濃度を約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ に維持するためには、およそ成人1人あたり1日に $10\text{mg}/\text{kg}$ 程度のジンセノサイドR_{g1}投与が必要になると判断いたします。すなわち、体重 60kg の脳・神経疾患を有する患者には1日あたり 600mg 程度のジンセノサイドR_{g1}が必要になると当業者は判断いたします。通常ジンセノサイドR_{g1}は薬用人蔘（コウジン末）から 0.05% 程度の収率で精製できますので、 600mg のジンセノサイドR_{g1}を作成するのにおよそ 1.2kg の薬用人蔘が必要ということになります。世界中で毎年脳血管障害だけでも約 460 万人が死亡しておりますが、このうち本邦の 10 万人程度の急性期脳卒中患者にジンセノサイドR_{g1}を全身投与すると仮定しましても薬用人蔘が1日あたり 120t 必要になります。しかし、 120t の薬用人蔘から常時一定の高品質・高純度のジンセノサイドR_{g1}を精製する技術はいまだ特定の研究室を除いては確立しておりませんし、ジンセノサイドR_{g1}の抗アポトーシス作用は格別他の抗アポトーシス剤と比較して優れているわけでもありませんので、この時点で当業者はジンセノサイドR_{g1}の医薬組成物としての将来性に強い疑問を抱くのであります。さらに、ジンセノサイドR_{g1}は現時点では人工的な化学合成が不可能な化合物でありますので、やはりジンセノサイドR_{g1}の安定供給が困難であると当業者は判断するのが常であります。しかも、急性期脳卒中患者一人に1日あたり投与するためのジンセノサイドR_{g1}を作成するだけで、 1.2kg の薬用人蔘（約 4 万円相当）と2週間の時間と人件費を要しますので、原価、時間、人件費を考慮に入れますと、ジンセノサイドR_{g1}を医薬組成物として開発することはほぼ不可能であると当業者は考えるのであります。従いまして、当然のことながら文献1から、当業者は合成不可能なジンセノサイドR_{g1}をリード化合物として利用することにより、新規の脳・神経疾患治療用化合物を作成しようなどとは、想到しないのであります。

文献3は、ジンセノサイドR_{b1}を $40\text{mg}/\text{kg}$ の至適用量で中大脳動脈を永久閉塞する前に静脈内投与しておけば軽微な効果が得られること、ならびに同

じ用量で中大脳動脈の虚血再灌流傷害にも虚血前もしくは後に静脈内投与しておけば有意な効果が得られることを示しておりますが、 40 mg/kg のジンセノサイドRb₁静脈内投与の効果は、他の医薬組成物（たとえばグルタミン酸拮抗薬）と比べて決して優るものではありません。しかも 40 mg/kg のジンセノサイドRb₁を体重 60 kg の急性期脳卒中患者に静脈内投与するとなると、一人あたり1日に 2.4 g のジンセノサイドRb₁が必要になると当業者は判断いたします。通常ジンセノサイドRb₁は薬用人蔘（コウジン末）から 0.1% 程度の収率で精製できますので、 2.4 g のジンセノサイドRb₁を作成するのにおよそ 2.4 kg の薬用人蔘（コウジン末）が必要ということになります。世界中で毎年脳血管障害だけでも約 460 万人が死亡しておりますが、このうち本邦の 10 万人程度の急性期脳卒中患者にジンセノサイドRb₁を全身投与すると仮定しましても薬用人蔘が1日あたり 240 t 必要になります。しかし、 240 t の薬用人蔘から常時一定の高品質・高純度のジンセノサイドRb₁を精製する技術はいまだ特定の研究室を除いては確立しておりませんし、高用量（ 40 mg/kg ）のジンセノサイドRb₁静脈内投与の効果は格別優れたものでもありませんので、この時点で当業者はジンセノサイドRb₁の医薬組成物としての将来性に強い疑問を抱くのであります。さらに、ジンセノサイドRb₁は、他のジンセノサイド類（精製サポニン）と同様に現時点では人工的な化学合成が不可能な化合物でありますので、やはり一定の高純度・高品質のジンセノサイドRb₁の安定供給が困難であると当業者は判断するのが常であります。しかも、急性期脳卒中患者一人に1日あたり投与するためのジンセノサイドRb₁を作成するだけで、 2.4 kg の薬用人蔘（約 8 万円相当）と2週間の時間と人件費を要しますので、原価、時間、人件費を考慮に入れますと、ジンセノサイドRb₁を医薬組成物として開発することはほぼ不可能であると当業者は考えるのであります。また、 40 mg/kg というジンセノサイドRb₁の投与用量は、ジンセノサイドRb₁静脈内投与のLD₅₀が 500 mg/kg であることを考えますと、将来的には副作用出現の可能性も危惧しなければなりませんので、当業者としてはこのような高用量のジンセノサイドRb₁を医薬品として開発することなど到底考えられないのであります。従いまして、当然のことながら文献3から、当業者は合

成不可能なジンセノサイドRb₁をリード化合物として利用することにより、新規の脳・神経疾患治療用化合物を作成しようなどとは、想到しないのであります。

文献4は、スナネズミの一過性前脳虚血モデルというごく軽症の海馬CA1領域の障害に対して、ジンセノサイドRb₁の腹腔内投与（至適投与量20mg/kg程度）が予防効果を示しますが、治療効果は示さないことを記述しております。このような軽微な効果では、当業者はジンセノサイドRb₁が医薬組成物として開発できるとは到底考えることはできません。しかも、文献3について記述したごとく20mg/kgという高用量のジンセノサイドRb₁をヒトに投与すること、すなわちジンセノサイドRb₁を医薬品として開発することは、原末バルク確保の困難、経済性、開発リスクを考慮しますと、ほぼ不可能と言わざるを得ません。従いまして、当然のことながら、文献4から、当業者は合成不可能なジンセノサイドRb₁をリード化合物として利用することにより、新規の脳・神経疾患治療用化合物を作成しようなどということは、想到しないのであります。

文献5は、 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の至適細胞外液濃度でジンセノサイドRb₁又はジンセノサイドRg₁がグルタミン酸の神経毒性を軽減するということを記述しておりますが、やはり文献1、3、4について記載したことと同様の理由で、文献5からも当業者は合成不可能なジンセノサイドRb₁又はジンセノサイドRg₁をリード化合物として利用することにより、新規の脳・神経疾患治療用化合物を作成しようなどとは想到しないのであります。

文献8は、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ もしくは $30\mu\text{g}/\text{ml}$ という至適細胞外液濃度でジンセノサイドRb₁、ジンセノサイドRb₂、ジンセノサイドRb₃が心筋細胞に対して好ましい効果を及ぼすことを記述しておりますが、やはり文献1、3、4について記載したことと同様の理由で、文献8からも当業者は合成不可能なジンセノサイドRb₁、ジンセノサイドRb₂、又はジンセノサイドRb₃をリード化合物として利用することにより、新規の脳・神経疾患治療用化合物を作成しようなどとは想到しないのであります。

文献15は、体重50kgのアルツハイマー病患者にジンセノサイドRb₁又はジンセノサイドRg₁を1日あたり100～1000mg経口投与すれば、神経細胞からのアセチルコリン遊離促進を介して痴呆症状が軽減されることを記述

しております。しかし、文献 15 では、実際にアルツハイマー病モデル動物にジンセノサイド R b₁ 又はジンセノサイド R g₁ を経口投与した実施例は示されておりませんし、ジンセノサイド R b₁ 又はジンセノサイド R g₁ のアセチルコリン遊離促進作用も格別目を見張るものではありません。また、近年アセチルコリン含有神経細胞の機能低下がアルツハイマー病の病因であるという説は、ほぼ完全に否定されておりますので、当業者が文献 15 の情報をもとに、ジンセノサイド R b₁ 又はジンセノサイド R g₁ をリード化合物として利用することにより新規にアセチルコリン遊離促進用化合物を作成しアルツハイマー病治療薬を開発しようなどということは、まずもって想到できないことであります。しかも、アルツハイマー病のような慢性疾患に対して、年余にわたって 1 日あたり 100 ~ 1000 mg（平均 500 mg 程度）のジンセノサイド R b₁ 又はジンセノサイド R g₁ を投与することは、文献 1、3、4 について記載したことと同様の理由で、原末バルク（原体）確保の困難、経済性、開発リスクを考慮しますと、まずもって不可能であります。すなわち、文献 15 の情報から、当業者はジンセノサイド R b₁ 又はジンセノサイド R g₁ をアルツハイマー病の痴呆症状改善用医薬組成物として開発することはほぼ不可能と判断するのであります。従いまして、当然のことながら文献 15 から当業者は合成不可能なジンセノサイド R b₁ 又はジンセノサイド R g₁ をリード化合物として利用することにより、新規の脳・神経疾患治療用化合物を作成しようなどとは想到できないのであります。

一方、本件明細書では体重 300 g 程度の脳梗塞ラット（中大脳動脈皮質枝永久閉塞ラット）に脳梗塞発症後ジンセノサイド R b₁ を 6 - 60 μ g / 日の用量（すなわち 20 μ g / kg ~ 200 μ g / kg の用量）で静脈内投与すると、脳梗塞体積がコントロールの 3 分の 1 から 4 分の 1 程度に縮小することが見出されております。この効果は歴史上類をみない優れたものであります。さらに、本発明では、前記した低用量のジンセノサイド R b₁ の静脈内投与（12 - 60 μ g / 日）が寝たきりの脊髄損傷ラットを起立せしめるという歴史上かつてない程優れた効果が見出されております。また、前記した急性期脳梗塞（脳卒中）治療に必要なジンセノサイド R b₁ の全身投与量は、体重 60 kg の急性期脳卒中患者に対して 1 日あたり 1 mg 程度と考えられますので、10 万人の急性期脳卒中患



者に投与すると仮定しましてもおよそ、ジンセノサイドRb₁が100g程度あれば事足りることになります。ジンセノサイドRb₁は、精製ノウハウを有する特定の研究室であれば薬用人蔘（コウジン末）から0.1%の収率で高純度・高品質のものが作成されますので、100g程度のジンセノサイドRb₁であれば100kg程度の薬用人蔘から容易に精製することが可能であります。かくして、本件明細書において、従来まったく考えられなかった低用量・低濃度のジンセノサイドRb₁の静脈内投与が、歴史上かつてないほど優れた脳卒中・脊髄損傷治療効果を示しましたので、この時点で始めてジンセノサイドRb₁が医薬組成物（医薬品）として実用化される高い可能性が見出されたわけであります。すなわち、低用量での並はずれた薬効と原末バルク（原体）確保の見通しが本件明細書において明らかにされましたので、本発明者らはジンセノサイドRb₁をリード化合物として利用することにより新規に脳・神経疾患治療用化合物を作成できると想到したわけであります。このようなアイデアは、文献1-11、15からは到底思い浮かぶことはできないことであります。

さらに、本発明者らはジンセノサイドRb₁をリード化合物として利用することにより新規に脳・神経疾患治療用医薬組成物を作成できることを証明するため、実施例17においてジンセノサイドRb₁を原材料としてジヒドロジンセノサイドRb₁を97%の収率で作成し、低用量（6μg/日）のジヒドロジンセノサイドRb₁静脈内投与による脳梗塞治療効果を実証したのであります。ジヒドロジンセノサイドRb₁は、本件明細書54頁5行目に記載のごとく患部組織における細胞外液濃度が0.01fg/ml程度でも十分な脳・神経疾患治療効果を示すことを本発明者らは本件明細書出願時点で確認しておりましたので、ジンセノサイドRb₁の至適細胞外液濃度の下限が1fg/ml程度であることを考えますと、ジヒドロジンセノサイドRb₁の全身投与量はジンセノサイドRb₁の全身投与量（6μg/日）よりもさらに少なくなることが本件明細書より推測できます。言い換えますと、ジヒドロジンセノサイドRb₁を医薬組成物として利用すれば、ジンセノサイドRb₁を利用する場合よりもさらに少量の薬用人蔘（コウジン末）確保で事足りることが、本発明において推測されたわけであります。すなわち、本件明細書は、文献1-11、15からは当業者が想到することが困

難なほど低用量・低濃度のジンセノサイドRb₁が歴史上かつてないほど優れた脳梗塞・脊髄損傷治療効果を示すことを明らかにすることにより、始めてジンセノサイドRb₁が脳・神経疾患治療用のリード化合物となり得ることを実施例17により証明したわけであります。

さらに、本件明細書では実施例10においてジンセノサイドRb₁を含有する薬用人蔘粗サポニン分画を低用量で静脈内投与しても、寝たきりの脊髄損傷ラットを起立せしめるという歴史上かつてない効果が認められております。従いまして、薬用人蔘粗サポニン分画含有成分のいずれかが、ジンセノサイドRb₁と同様に低用量・低濃度で優れた脳・神経疾患治療効果を示すことが明らかにされたわけでありますので、前記したジンセノサイドRb₁と同様の理由で、薬用人蔘粗サポニン分画含有成分のいずれかをリード化合物として利用して新規に脳・神経疾患治療用化合物を作成することが可能となります。もちろん、このことも前記したごとく文献1-11、15から当業者が想到することは困難な事項であります。

従いまして、請求の範囲第81項～89項は、文献1-11、15から当業者が想到することは困難な事項でありますので、進歩性を有します。

(16) 以上のとおりでありますから、本件の補正後の請求の範囲に記載の発明はいずれも新規性、進歩性及び産業上の利用可能性を有するものであります。

以 上

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所

PCT/JP00/04102

PE402

P C T



国際予備審査請求書の受理通知書

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、実施細則601(a)〕

出願人又は代理人の書類記号 JA903279		発送日（日．月．年） 21.11.00
国際出願番号 PCT/JP00/04102	国際出願日（日．月．年） 22.06.00	優先日（日．月．年） 30.08.99
出願人（氏名又は名称） 科学技術振興事業団		

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

13日11月00年

2. この受理の日は次に示す日である。

- ☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則61.1(b)）
- ☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則59.3(e)）
- ☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）
詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名 日本国特許庁（IPEA/JP） 郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308 日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 様式PCT/IPEA/402（1998年7月）	権限のある職員 特許庁長官
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------



特許協力条約に基づく国際出願
国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。



国際予備審査機関記入欄		
国際予備審査機関の確認		請求書の受理の日
第 I 欄 国際出願の表示		出願人又は代理人の書類記号 JA 9 0 3 2 7 9
国際出願番号 PCT/JP00/04102	国際出願日 (日. 月. 年) 22.06.00	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 30.08.99
発明の名称 薬用人参からなる脳細胞または神経細胞保護剤		
第 II 欄 出願人		
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 科学技術振興事業団 Japan Science and Technology Corporation 〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号 1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012 JAPAN		電話番号: ファクシミリ番号: 加入電話番号:
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 阪中 雅広 SAKANAKA Masahiro 〒791-0204 日本国愛媛県温泉郡重信町大字志津川 1191番地13 1191-13, Oaza Shitsukawa, Shigenobu-cho, Onsen-gun, Ehime 791-0204 JAPAN		
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 前田 信治 MAEDA Nobuji 〒790-0903 日本国愛媛県松山市東野5丁目甲911-69 Ko 911-69, 5-chome, Higashino, Matsuyama-shi, Ehime 790-0903 JAPAN		
国籍 (国名): 日本国 JAPAN	住所 (国名): 日本国 JAPAN	
<input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人が税関に記載されている。		

第 II 欄の続き 出願人

この第 II 欄の続きを使用しないときは、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

田 中 潤 也 TANAKA Junya

〒791-0203 日本国愛媛県温泉郡重信町大字横河原

3 5 5 - 3 1

355-31, Oaza Yokogawara, Shigenobu-cho, Onsen-gun,

Ehime 791-0203 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

仲 田 公 彦 NAKATA Kimihiko

〒799-3111 日本国愛媛県伊予市下吾川 8 5 3

853, Shimoagawa, Iyo-shi, Ehime 799-3111 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍 (国名):

住所 (国名):

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍 (国名):

住所 (国名):

☐ その他の出願人が他の続表に記載されている。

第Ⅲ欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

10266 弁理士 佐伯 憲生 SAEKI Norio

電話番号：

03-5205-2521

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

ファクシミリ番号：

03-5205-2522

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi 3-chome,

加入電話番号：

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

☐ 通知のためのあて名：代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第Ⅳ欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☐ 明細書に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 請求の範囲に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正（添付した説明書も含む）を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲に関する補正を差し替えることによって考慮されることを望む。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過後まで延期されることを望む（ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の受理の受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く（規則69.1(d)））。（この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合のみ、レ印を付すことができる。）

* 記入がない場合は、1) 補正がないか又は国際予備審査機関が補正（原本又は写し）を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2) 国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正（原本又は写し）を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は 日本語 であり、

☒ 国際出願の提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第Ⅴ欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国（即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第Ⅱ章に拘束されている国）を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。：



第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

国際予備審査機関記入欄

		受 領	未 受 領
1. 国際出願の翻訳文	枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書	枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書 (又は、要求された場合は翻訳文)の写し	枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書 (又は、要求された場合は翻訳文)の写し	枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. 書簡	枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. その他 (書類名を具体的に記載する) :	枚	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

- | | |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 | 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を
貼付した書簡 | 4. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) に関する説明書 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込を証明する書面 | 5. <input type="checkbox"/> スクレスオッド又はアミノ酸配列表
(クレキシブルディスク) |
| 2. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 6. <input type="checkbox"/> その他 (書類名を具体的に記載する) : |

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

佐 伯 憲 生



国際予備審査機関記入欄

.. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則 60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4, 5の項目にはあてはまらない。 ☐ 出願人に通知した。4. ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:



第 II 章

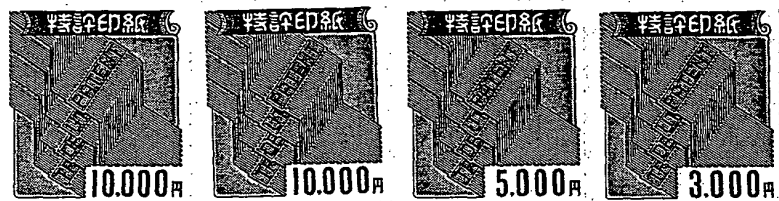
P C T

手 数 料 計 算 用 紙

国 際 予 備 審 査 請 求 書 の 附 属 書

国際出願番号 PCT/J P 00 / 0 4 1 0 2		国際予備審査機関記入欄	
出願人又は代理人の登録記号 J A 9 0 3 2 7 9		国際予備審査機関の日付印	
出願人 科学技術振興事業団			
所定の手数料の計算			
1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法） 第18条第1項第4号の規定による手数料 （予備審査請求料）（注1）	2 8 , 0 0 0 円 P		
2. 取扱手数料（注2）.....	1 4 , 6 0 0 円 H		
3. 所定の手数料の合計 P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入・・・	4 2 , 6 0 0 円		
		合 計	
（注1）法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。			
（注2）取扱手数料については、国際予備審査機関である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振り込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。			





予備審査請求手数料

28,000円

ご利用明細

ご来店いただき
ありがとうございます。



東京三菱銀行

年月日 121107	取扱店番 00225006	お取引内容 お振込
受付通番 1851	銀行番号 0022	支店番号 0632671
時刻 14.02	税込手数料 ¥105*	お取引金額 ¥14,600*
お取引いただき ない場合	残高	
お取扱金額 *****		
ご案内 お振込先は 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA様 ご依頼人は タクミツキョウムシヨ サエキ ノリ オ様 電話 0352052521		



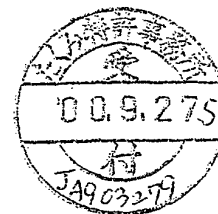
取扱手数料

14,600円



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)



出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋三丁目15番2号
高愛ビル9階

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)
[PCT規則44.1]

発送日
(日.月.年) 26.09.00

出願人又は代理人
の書類記号 JA903279

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号
PCT/JP00/04102

国際出願日
(日.月.年) 22.06.00

出願人 (氏名又は名称)
科学技術振興事業団

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出
出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。
いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。
詳細については添付用紙の備考を参照すること。
どこへ 直接次の場所へ
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22)740.14.35
詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。
2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
3. ☐ 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。
☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。
☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。
4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。
優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。
出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。
国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員
特 許 庁 長 官

4C 8415

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。
3. 文献の写しの請求について
国際調査報告に記載した文献の複写
特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

- (1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。
 - 特許・実用新案及び意匠の種類
 - 出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)
 - 必要部数
- (2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。
 - 国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課
TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT34条の規定に基づく国際予備審査の手続きにおいて請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT28条（又はPCT41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合には、以下を参照すること。

どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならず、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならず、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/IPEA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

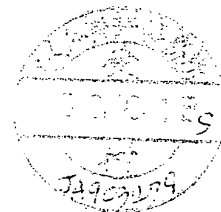
国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕



出願人又は代理人 の書類記号 JA903279	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/04102	国際出願日 (日.月.年) 22.06.00	優先日 (日.月.年) 30.08.99
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 6 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。
☒ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1、2、18、40、43は、薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなるそれぞれ1)細胞死抑制遺伝子産物Bcl-xLの発現を促進させるための医薬組成物、2)細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、3)脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物、4)心臓疾患の治療、予防または処置のための医薬組成物又は5)静脈内投与製剤に係わる発明である。また、請求の範囲53、56、58、60は、ジンセノサイドRb1もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるそれぞれ5)生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物、6)褥創の予防・治療・処置用医薬組成物、(続き有り)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅲ欄 要約 (第1ページの5の続き)

本発明は、細胞保護剤、神経外傷治療剤として有用な薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩、例えばコウジン末もしくはその成分からなる医薬組成物、投与用製剤を提供する。より詳細には、好ましくは低濃度の薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物またはそれらの塩からなる、アポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物又は細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x_L の発現を促進させるための医薬組成物、又は、経口投与用製剤または静脈投与用製剤を提供するものである。本発明の医薬組成物、投与用製剤は、低濃度の薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を有効成分として含有することを特徴とするものである。

本発明の薬剤は、特に脳・神経疾患、心臓疾患などの治療、予防又は処置のために有用である。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 32, no. 6, p406-410, 1997 "Study on the anti-apoptotic mechanism of ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons" JQ Li et al	2-5, 9, 18-21 81, 83-89
X	Korean J. Ginseng Sci., vol. 22, no. 1, p66-72, 1998 "Radioprotective Effect of Red Ginseng in Irradiated Mice with High and Low Dose of Radiation" Sung-Ho Kim et al	2-5, 9
X Y	Acta Pharm. Sinica, vol. 17, no. 1, p44-48, 1996 "Influences of ginsenosides Rb1 and Rg1 on reversible focal brain ischemia in rats" ZHANG Ying-Ge et al	18-21, 24, 25, 43, 47 22, 23, 27, 44-

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.09.00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C 8415

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Neuroscience Research vol. 28, p191-200, 1997	46, 81-89
Y		18-21
X	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 30, no. 9, 1995	81-89
Y		18-21
X	Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 8, no. 1, p7-12, 1994 "Protective Effects of Total Saponins of Panax Ginseng on ischemia-reperfusion injury in rat brains" ZHANG Ying-Ge et al	81-89
X	Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 3, no. 1, p18-21, 1989 "Protective effect of ginsenoside on acute cerebral ischemia/reperfusion injury of rats" CHU, Guoxiang et al	18-21, 37-39
X	Acta Pharmacologica Sinica, vol. 13, no. 5, p403-406, 1992 "Influences of ginsenosides Rb1, Rb2, and Rb3, on electric and contractile activities of normal and damaged cultured myocardiocytes" JIANG Yan et al	37-39, 43, 47, 48
Y		40, 42
X	Acta Pharmacologica Sinica, vol. 7, no. 3, p222-226, 1986 "Beneficial changes in prostacyclin and thromboxane A ₂ by ginsenosides in myocardial infarction and reperfusion injury of dogs" FANG Yun-xiang et al	41
Y		40, 44, 49, 52
X	Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, vol. 23, no. 8, p728-732, 1996 "CARDIOVASCULAR PROTECTION BY GINSENOSES AND THEIR NITRIC OXIDE RELEASING ACTION" Xiu Chen	41, 42
Y	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 22, no. 1, p1-5, 1987 "THE PROTECTIVE EFFECT OF GINSENOSES AND ITS COMPONENTS ON MYOCYTES ANOXIA/REOXYGENATION AND MYOCARDIAL REPERFUSION INJURY" LI Yuan-Jian	40, 42
A	Chem. Pharm. Bull., vol. 40, no. 2, p314-317, 1992 "Studies on the Enzyme Immunoassay of Bio-active Constituents in Oriental Medicinal Drugs. VI. Enzyme Immunoassay of Ginsenoside Rb1 from Panax ginseng" Matao Kanaoka et al	41
Y	Chem. Pharm. Bull., vol. 21, no. 13, p2702-2711, 1973 "Studies on the Constituents of Himalayan Ginseng, Panax pseudoginseng. I. The Structure of the Saponins" Noriko Kondo et al	40, 42
P, X	JP, 2000-159793, A (大正製薬株式会社) 13. 6月. 2000 (13. 06. 00) ファミリーなし	74-80
X	JP, 6-316527, A (毛利哲朗) 15. 11月. 1994 (15. 11. 94) ファミリーなし	74-80
X	WO, 90/08315, A (PANG P K T) 26. 7月. 1990 (26. 07. 90) & JP, 4-504414, A&US, 4966893, A&EP, 453515, A&US, 5137878, A&DE, 69032201, B&KR, 160104, B	2, 3, 5, 9, 40
Y		41
		18, 19
		18-21
		81-89

PCT/JP00/04102

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

1170209

22.06.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 8月30日

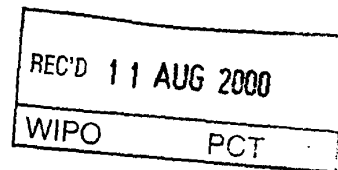
出願番号
Application Number:

平成11年特許願第243378号

出願人
Applicant(s):

科学技術振興事業団

JP 00/04102
Eku

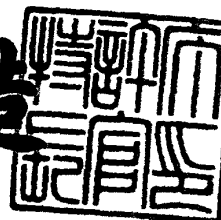


PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月28日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3058512

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA900760

【提出日】 平成11年 8月30日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 A61K

【発明者】

 【住所又は居所】 愛媛県温泉郡重信町大字志津川 1 1 9 1 番地 1 3

 【氏名】 阪中 雅広

【発明者】

 【住所又は居所】 愛媛県松山市東野 5 丁目甲 9 1 1 - 6 9

 【氏名】 前田 信治

【発明者】

 【住所又は居所】 愛媛県温泉郡重信町大字横河原 1 3 7 5 愛大横河原宿舎
 1 1 5 号

 【氏名】 田中 潤也

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

 【代表者】 理事長 中村 守孝

【代理人】

 【識別番号】 100102668

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 佐伯 憲生

 【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 039251

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

特平 1 1 - 2 4 3 3 7 8

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 薬用人蔘からなる脳細胞または神経細胞保護剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x_L の発現を促進させるための医薬組成物。

【請求項 2】 薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物を含有してなるアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物。

【請求項 3】 薬用人蔘のエキスが薬用人蔘の抽出物である請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】 薬用人蔘若しくはそのエキスが、コウジン末又はその抽出物である請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】 薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物が、薬用人蔘の粗サポニン分画、非サポニン分画又は精製サポニンである請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】 細胞が、脳細胞又は神経細胞である請求項 1～5 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 7】 細胞が、肝臓又は脾臓の細胞である請求項 1～5 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 8】 経口投与用製剤である請求項 1～7 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 9】 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための請求項 1～8 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 10】 脳・神経疾患が、脳血管性痴呆、脳梗塞又は脳卒中である請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】 薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物からなる脳・神経疾患の治療、予防又は処置剤。

【請求項 12】 薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそ

これらの代謝産物からなる脳細胞又は神経細胞保護剤。

【請求項 1 3】 薬用人蔘に含有される活性成分をリード化合物として脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を検索する方法。

【請求項 1 4】 脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を検索するために薬用人蔘に含有される活性成分のリード化合物としての使用。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞保護剤として有用な薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物に関する。より詳細には、薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を含有してなるアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、又は薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物 B c l－x_L 蛋白の発現を促進させるための医薬組成物に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

脳卒中や神経変性疾患等の難治性神経疾患においては、共通して脳細胞又は神経細胞が死に至り、その結果非可逆的な高次神経機能障害がもたらされる。ひとたび、このような機能障害が生じると、その改善・治療・処置は困難を極め患者の Q O L (quality of life, 生活の質) が長年にわたって著しく損なわれる。従って、脳細胞又は神経細胞が死に至る前に、これらの細胞を有効に保護する優れた経口投与製剤が是非必要になるわけであるが、目下の所そのような医薬組成物は発明されていない。

さて、薬用人蔘の中でもコウジン末（紅蔘末）は漢方処方において頻繁に使用され、循環改善作用や自律神経－内分泌系の賦活作用など、多彩な薬効を有する生薬の 1 つとして位置付けられている。慢性期脳血管障害患者に対しても、コウジン末を経口投与することにより、患肢の冷感・しびれ感が改善し、深部皮膚温が上昇することが報告されている。この効果は主として、コウジン末の循環改善作用に起因するものと考えられている（山口武典、脳血管障害後遺症に対する薬

用人蔘の効果、薬用人蔘' 95、ページ6-18、熊谷 朗編、共立出版)。しかしながら、コウジン末を慢性期脳血管障害患者(慢性期脳卒中患者)に経口投与しても、脳卒中病巣そのものが改善するという報告はみられない。また、コウジン末が急性期脳血管障害(急性期脳卒中)の予防・治療・処置のために一般臨床の場で使用されているという事実も見当たらない。さらにコウジン末が、神経細胞死を伴うその他の神経変性疾患、頭部外傷、脊髄損傷等に臨床の現場で使用されるという実験医学的根拠もまったく存在しない。

【0003】

本発明者の一人(阪中)は、スナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷する前に、コウジン末を0.9g/kg/日または1.5g/kg/日の用量で1日単回7日間経口投与しておく、と、脳虚血後の学習行動障害が有意に改善され海馬CA1領域の神経細胞死も有意に予防されることを証明した(Wen et al., Acta Neuropathol. 91, 15-22, 1996)。ちなみに、一過性前脳虚血を負荷されたスナネズミは、ヒトの一過性脳虚血発作のモデルと考えられている。しかし、5分間の一過性前脳虚血後に1週間コウジン末を同様の用量で経口投与しても、スナネズミ海馬CA1領域の神経細胞死は抑止されなかった、ので、コウジン末の経口投与による神経細胞保護効果は、それほど強力ではなく、コウジン末を一過性脳虚血発作よりも重篤な脳梗塞患者に応用するには無理があると考えられていた。しかも、コウジン末の経口投与がどのようなメカニズムで海馬CA1領域の遅発性神経細胞死を抑止するのかは明らかにされていない。もし、この作用メカニズムが解明されればコウジン末の新たな効果・効能が発明されるものと期待される。本発明では、まずコウジン末の経口投与が、スナネズミの一過性前脳虚血モデルよりも重篤でかつヒト脳梗塞の病態に近い中大脳動脈皮質枝永久閉塞ラットにおいて、思いもよらぬ優れた脳梗塞抑止作用ならびに場所学習障害改善作用を示すことを見出した。また、コウジン末の経口投与が、細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x_L蛋白質の発現を促進することにより神経細胞を保護することを見出し、本発明を完成した。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は経口投与により優れた脳細胞又は神経細胞保護効果を示し、かつ細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-2 蛋白の発現を促すことにより細胞を保護する薬物を提供することである。

また、本発明は、細胞保護剤として有用な薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物の有効な経口投与用製剤を提供する。より詳細には、薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を含有してなるアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、又は、薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-2 蛋白の発現を促進させるための医薬組成物を提供するものである。また、本発明は薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を含有してなる脳・神経疾患の治療、予防又は処置などのために有用な経口投与製剤を提供するものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明は、薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を含有してなるアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物に関する。

また、本発明は、薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-2 蛋白の発現を促進させるための医薬組成物に関する、これらの本発明の医薬組成物は、経口投与用製剤が好ましい。

さらに、本発明は、薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物からなる脳・神経疾患の治療、予防又は処置などのための経口投与用製剤に関する。

また本発明は、薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物からなる脳・神経疾患の治療、予防若しくは処置剤、又は脳細胞若しくは神経細胞保護剤に関する。

本発明は、脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物として薬用人蔘に含まれる成分が活性であることを初めて提供するものであり、本発明のこの新規な

知見に基づけば、本発明は薬用人蔘に含有される活性成分をリード化合物として脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を検索する方法を提供するものであり、また、本発明は、脳細胞又は神経細胞の保護作用を有する化合物を検索するために薬用人蔘に含有される活性成分のリード化合物としての使用を提供するものである。

【 0 0 0 6 】

本発明の薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物としては、薬用人蔘、その乾燥物、その一部、それらの粉末又は顆粒物、コウジンエキスなどのそれらの抽出物、粗サポニン分画や精製サポニン分画や非サポニン分画などのそれらの分画、それらから分離される精製サポニン類などの成分、それらの成分の活性な代謝産物などが挙げられる。好ましい薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物としては、コウジン末が挙げられるがこれに限定されるものではない。

本発明の好ましいコウジン末は、韓国煙草人蔘公社がPanax ginseng C.A. Meyer (和名オタネニンジン) の6年根を用いて調整した公知のものであり、その品質の安定性については、発明者らもすでに公表した論文において確認している (Wen, T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996)。なお、本邦では、これを販売会社の名にちなんで正官庄コウジン末と呼んでいる。

以下の説明においては、本発明の薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物としてコウジン末もしくはその抽出物を例として使用する。

【 0 0 0 7 】

本発明の医薬組成物は、薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物を有効成分とする単剤として使用することもできるが、他の脳卒中危険因子軽減用薬剤 (例えばビタミン剤、脳循環代謝改善剤、活性酸素・フリーラジカル消去剤、高脂血症治療薬、等) との合剤として使用することもできる。

また、本発明の医薬組成物は、製薬上許容される担体を含むことができる。これらの担体として、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤などの医薬の製薬に通

常使用されるものを使用することができる。これらの担体を用いて、錠剤、散剤、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、座剤などの剤型に製剤化することもでき、必要に応じてコーティング製剤とすることもできる。また非経口投与剤として製剤化することもできる。

【0008】

本発明のコウジン末もしくはその抽出物は、経口投与で虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) におけるアポトーシス様神経細胞死を抑止することにより脳梗塞巣を有意に縮小させ、しかも細胞死抑制遺伝子産物 Bcl- \times _L 蛋白発現増強というユニークな作用機序を有し、脳の神経細胞を保護するものであり、急性期・慢性期の脳梗塞のみならず脳出血・クモ膜下出血の急性期や慢性期あるいは一過性脳虚血発作に対しても、神経細胞保護薬として利用することができる。

すなわち、本発明のコウジン末もしくはその抽出物は脳卒中が疑われる患者に対して、患者の意識と嚥下機能が保持されている限り、在宅でも経口投与可能な薬物である。また、糖尿病、高血圧症、脳動脈硬化症、心房細動、脳動脈瘤、等の基礎疾患を有する脳卒中予備群とも言うべき高齢者もしくは脳卒中の既往歴を有する患者が、あらかじめコウジン末を服用しておくこと、万一不幸にして脳卒中発作に見舞われても、コウジン末を服用し続けることにより脳卒中病巣や高次神経機能障害がコウジン末非服用患者に比べて著しく改善する。

脳虚血という病態は脳梗塞のみならず、心不全、重症貧血、呼吸障害、心停止、心室細動、低血圧症等に伴って生じることが知られている。これらの疾患から脳を守り患者の予後を改善するためにも、本発明のコウジン末もしくはその抽出物からなる医薬組成物は極めて有効なものである。さらに、コウジン末もしくはその抽出物は歴史的にみても副作用をほとんど示さないことで知られており、本発明者らが今回の各実験例において、コウジン末を経口投与した動物を注意深く観察した範囲内でも、副作用は検出されなかった。

【0009】

また、本発明の薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物、好ましくはコウジン末を経口投与することにより神経組織における細胞死抑制遺伝子産物 Bcl- \times _L 蛋白の発現が促進されること、ならびにコウ

ジン末の経口投与が虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) におけるアポトーシス様神経細胞死を抑止することから判断すれば、本発明の薬用人参若しくはそのエキス又は薬用人参成分若しくはそれらの代謝産物、好ましくはコウジン末若しくはその抽出物からなる医薬組成物はアポトーシス様神経細胞死を伴う一次性および二次性神経変性疾患（アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、脱髄疾患、舞踏病、筋萎縮性側索硬化症、緑内障、老人性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、網膜中心動静脈閉塞症、網膜剥離、網膜色素変性症、エイズ脳症、肝性脳症、脳炎、脳性マヒ、頭部外傷、脊髄損傷、一酸化炭素中毒、新生児仮死、末梢神経障害、痙性対麻痺、進行性核上性麻痺、脊髄血管障害、ミトコンドリア脳筋症、髄膜炎、等）に対しても効能を示すと思われる。

【0010】

さて、体重 60 kg の成人に投与するある薬物の量を 1 とすると、体重 3 kg の新生児に投与する同薬物の量は一般にその 7 分の 1 程度になる。すなわち体重 1 kg あたりの薬物投与量は新生児の場合、成人の約 3 倍になるのである。このことから類推すると新生児よりもさらに体重が少ないラット（体重 250～300 g）やスナネズミ（体重 70～80 g）では、体重 1 kg あたりの薬物投与量は、少なくともヒトの 4 倍程度に増えるものと考えられる。

一般に薬物の血中濃度は腎糸球体濾過量 (GFR) に依存すると考えられている。また GFR は体表面積と相関があることが知られているので、体表面積から割り出した薬物投与量算定法として Crawford の式、すなわち成人量 \times 体表面積 (m^2) / 1.73 を用いることができる。体重 60 kg 身長 170 cm のヒトの体表面積は約 $1.7 m^2$ 、体重 2 kg 身長 45 cm の新生児の体表面積は約 $0.16 m^2$ であるので、この計算式によれば、体重 60 kg 身長 170 cm のヒトの薬物投与量を 1 としたとき体重 2 kg 身長 45 cm の新生児の薬物投与量は約 10 分の 1 ということになる。すなわち、体重 1 kg あたりの薬物投与量は、体重 60 kg 身長 170 cm の成人で 60 分の 1、体重 2 kg 身長 45 cm の新生児で約 20 分の 1（すなわち成人の 3 倍）となるので、やはり体表面積をもとに薬物投与量を算出しても、前述のごとく体重 1 kg あたりの薬物投与量は、体重が少なくなるにつれて増加することが分かる。従って、2 kg の新生児

よりもさらに体重が少ないSH-SPラットやスナネズミでは、体重1kgあたりの薬物投与量は、ヒト成人（体重60kg）の体重1kgあたりの薬物投与量と比較して少なくとも4倍程度には多くなると考えられる。

【0011】

ところで、本発明のコウジン末は中大脳動脈皮質枝（MCA）を永久閉塞されたSH-SPラット（体重250～300g）において、0.75～1.2g/kg/日の用量でMCA閉塞前後5週間経口投与することにより脳梗塞巣を縮小せしめ場所学習障害（脳血管性痴呆）を改善するという本実験結果に基づけば、体重60kgのヒト脳卒中患者に投与する量は、体重あたりその4分の1として計算すると、1日総量で11.25gから18gということになる。従って、本発明の医薬組成物（コウジン末）のヒト脳卒中患者での経口投与量としては患者の個人差や病状にもよるが、1日あたり2.0g～90g、好ましくは5.625g～36g、より好ましくは11.25g～18gである。神経組織におけるBcl-x_L蛋白発現増強剤として、コウジン末を既述の一次性及び二次性神経変性疾患の予防・治療・処置に使用する場合も、同様の用量で患者に経口投与することが好ましい。また、コウジン末の抽出物（コウジンエキス、粗サポニン分画、非サポニン分画、各種精製サポニン）を経口投与する際にも、前記の用量のコウジン末から抽出した量を投与することが好ましい。

【0012】

このように脳神経疾患の治療・予防・処置のためには比較的高用量のコウジン末を経口投与する必要があるが、末梢臓器におけるBcl-x_L発現増強剤としてコウジン末を経口投与するときは、比較的低用量で事足りることを本発明では見出している。すなわち200mg/kg/日の用量でスナネズミにコウジン末を経口投与することにより、肝臓・脾臓でのBcl-x_L蛋白発現増強が認められるという本実験結果に基づけば、体重60kgのヒトの末梢臓器におけるBcl-x_L蛋白発現を促進するのに必要な量は、体重あたりその4分の1として計算すると、50mg/kg/日ということになる。従って、本発明の医薬組成物（コウジン末）をヒトの末梢臓器におけるBcl-x_L発現増強剤として使用する場合には、1日あたりの経口投与量としては、患者の個人差や病状にもよるが

、0.6g～15g、好ましくは1.5g～6g、より好ましくは2g～4gと考えられる。またこれと同量のコウジン末から抽出したコウジンエキス（紅蔘エキス）ならびに粗サポニン分画を経口投与しても同様に末梢臓器でのBcl-x_L蛋白発現量が増加するものと考えられる。

【0013】

細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x_Lは細胞を生かすための最後の砦とも言うべき蛋白質であり、脳神経組織のみならず肝臓、脾臓、免疫系組織、循環系組織、皮膚を始めとする多くの末梢臓器・組織に分布して、細胞の生存を支持している。従って、低用量のコウジン末を経口投与が肝臓・脾臓等の末梢臓器におけるBcl-x_L蛋白発現量を増加させるという本実験結果は、低用量のコウジン末が細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の治療・予防・処置に有効であることを物語っている。このような細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の中には、心筋・肝臓・腎臓の虚血再灌流障害、心筋症、心不全、心筋梗塞、末梢循環不全、褥創、自己免疫病、免疫不全病、臓器移植後の拒絶反応、筋ジストロフィー、角膜損傷、放射線障害、感染症、膠原病、大動脈炎症候群、急性動脈閉塞症、閉塞性血栓性血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群、血栓性静脈炎、肺炎、肝炎、腎炎、糖尿病性腎症、糖尿病性心筋症、舌痛症、等が含まれる。

本発明の医薬組成物は副作用が少なく、投与量の上限としてはかなり多量にすることもできるが、1日あたり180g以下、好ましくは100g以下である。

【0014】

次に本発明の薬用人蔘若しくはそのエキス又は薬用人蔘成分若しくはそれらの代謝産物の作用について詳細に説明する。まず発明者らは、コウジン末（韓国煙草人蔘公社製の6年根を原材料としたコウジン末すなわち本邦における正官庄コウジン末）の経口投与による作用を検討した。このために、例えば12～13週齢の雄性SH-SPラット（体重250～300g）を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。同動物の左中大脳動脈皮質枝（MCA）を発明者らの論文に記載した方法を用いて吸入麻酔下で凝固・切離した（Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2

53, 26-32, 1998)。コウジン末を蒸留水に混入し、MCA永久閉塞前1週間、MCA永久閉塞後32日間、1日単回経口投与した(0.6g/kg/日、0.75g/kg/日、0.9g/kg/日または1.2g/kg/日)。

なお、MCAを閉塞した対照動物(虚血コントロール動物)と、偽手術をした動物には同量の蒸留水のみを経口投与した。

【0015】

MCA永久閉塞後、発明者らの方法に従って(Zhang, B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998; Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253, 26-32, 1998)、2週目と4週目にそれぞれ4日間連続で水迷路テストを実施し、SH-SPラットの場所学習能力を判定した。

その結果を図1に示す。図1の上側は2週目の結果であり、同下側は4週目の結果である。また図1中の白丸印は蒸留水投与虚血群、黒丸印は偽手術群、白四角印はコウジン末0.6g/kg/日投与虚血群、黒四角印はコウジン末0.75g/kg/日投与虚血群、白三角印はコウジン末0.9g/kg/日投与虚血群、黒三角印はコウジン末1.2g/kg/日投与虚血群を示す。

図1のごとくMCA永久閉塞後(脳梗塞後)の場所学習障害が、蒸留水投与虚血群に比べて、コウジン末0.75~1.2g/kg/日投与虚血群で有意に改善された。特にコウジン末0.9g/kg/日投与虚血群でもっとも良好な効果がみられた。なお、SH-SPラットの水泳速度には各群で有意差はみられなかった。

【0016】

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-SPラットを抱水クロラルにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する0.1モルリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率(%)を算出した。その結果を図2に示す。

図2に示されるごとく、コウジン末0.75~1.2g/kg/日投与虚血群で蒸留水投与虚血群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。特にコ

ウジン末 0.9 g/kg/日投与虚血群で最も効果が強く、その大脳皮質梗塞比率の平均値が蒸留水投与虚血群の2分の1以下に減少していた。このことから、実際の脳梗塞体積は、コウジン末 0.9 g/kg/日の経口投与により約4分の1程度に縮小したことになる。

【0017】

図3上段に蒸留水投与虚血群の脳梗塞巣(4例)、図3下段にコウジン末 0.9 g/kg/日投与虚血群の脳梗塞巣(4例)を示す。

また図4に本実験結果をまとめた模式図を示す。蒸留水投与虚血群では脳梗塞病巣部が大きく、水迷路テストにおいて目的のプラットフォームに到達するまでに長時間を要しているのに対して、コウジン末投与虚血群においては病巣部が縮小しており、この結果水迷路テストにおいて目的のプラットフォームに短時間で到達している。

【0018】

本実施例に用いたMCA永久閉塞動物(脳梗塞ラット)は明らかに、スナネズミの一過性前脳虚血モデル(ヒト一過性脳虚血発作のモデル)よりも重篤でありかつヒトの脳梗塞の病態に近いモデルである。従って、このMCA永久閉塞動物において、コウジン末の経口投与が著効を示したということは、コウジン末が脳梗塞の予防・治療・処置に有用であることを物語っている。経口投与により、このように画期的な効果を示す薬物としてはコウジン末が世界で最初のものと考えられる。

特願平10-365560号(ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤)において、本発明者ら(阪中、田中)は、コウジン末の主成分であるジンセノサイドRb₁の静脈内投与がMCA永久閉塞ラットの脳梗塞巣を有意に縮小せしめることを発明している。しかし、ジンセノサイドRb₁そのものを経口投与しても神経細胞保護効果を示さないことを最近発明者は確認しているので、目下の所コウジン末が急性期脳梗塞ならびにそれに伴う学習行動障害の予防・治療・処置に適用される経口用医薬組成物として非常に有用なものと思われる。事実、ジンセノサイドRb₁やコウジン末を経口投与しても血中にジンセノサイドRb₁は検出されず、ジンセノサイドRb₁自体を単独で経口投与しても何

ら生理作用は認められないと報告されている（赤尾光昭ら、The Ginseng Review, 22, 97-102, 1996）。

【0019】

コウジン末の成分は大きく分けて粗サポニン分画と非サポニン分画からなるが、粗サポニン分画は、さらにプロトパナキサジオール系サポニン、プロトパナキサトリオール系サポニン、オレアノール酸系サポニンから構成される。プロトパナキサジオール系サポニンの代表がジンセノサイドRb₁、プロトパナキサトリオール系サポニンの代表がジンセノサイドRg₁、オレアノール酸系サポニンの代表がジンセノサイドRoである（Shibata, S., et al., Economic and medicinal plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985）。これまでこれら3つの代表的精製サポニンのほかに、30種類前後の精製サポニンの化学構造が決定されている。コウジン末の経口投与が明らかに神経細胞保護効果（神経細胞死抑止効果）を示し、ジンセノサイドRb₁自体の経口投与にはそのような効果がないことから判断すると、コウジン末中にはジンセノサイドRb₁以外にも神経細胞保護作用を示す物質が豊富に含まれることがまず想定される。ただし、コウジン末を経口投与することによりジンセノサイドRb₁の分解が抑止され測定閾値以下のジンセノサイドRb₁が消化管より血中に吸収される可能性は否定できないので、このように微量血中移行したジンセノサイドRb₁とコウジン末中の他の神経細胞保護物質の効果があいまって、有意な脳梗塞巣の縮小と場所学習能力障害改善作用がもたらされたと推測することも不可能ではない。コウジン末中に含まれるジンセノサイドRb₁以外の神経細胞保護物質の候補として、これまで化学構造が決定された精製サポニン、粗サポニン分画ならびに非サポニン分画に含まれる未知の成分があげられる。

【0020】

さて、MCAが永久閉塞するとMCAだけで栄養されている部位すなわち虚血中心部（ischemic core）の神経細胞はMCAが再開通しない限り、すみやかに壊死（ネクローシス）に陥り脳梗塞病変が形成されるので、いかなる薬物といえども虚血中心部の脳組織を救うことはまず出来ないと考えられる。なお、細胞死はその形態学的特徴よりネクローシス（壊死）とアポトーシスに大別されている

。ただ、神経細胞死に関しては、ネクローシスという概念は定着しているものの、一方のアポトーシスについては、病的成熟脳で類似の現象は観察されるがリンパ球にみられるような典型的特徴を示すものが非常に少ない。従って、本明細書ではネクローシスとは異なり緩徐に進行する神経細胞の死を“神経細胞のアポトーシス”あるいは“アポトーシス様神経細胞死”と定義することにする。しかし、神経細胞死を壊死（ネクローシス）とアポトーシス様神経細胞死に区別することすら困難な例もあることは周知の事実である。たとえば神経細胞が死に至る際、当初アポトーシス様の形態をとるものの、ある時期を境にして突然ネクローシスの特徴を呈するいわゆるpost-apototic necrosisという現象が存在することも事実である。そこで、本明細書ではこのような区別をすることが困難な場合には、単に神経細胞死という用語を使うこととする。

【0021】

一方、神経細胞の壊死（ネクローシス）が起こる虚血中心部（ischemic core）とは異なり虚血巣周辺部（ischemic penumbra）ではMCAからの血液供給がまったくなくなったあとでも、わずかながら前大脳動脈や後大脳動脈の皮質枝から血液供給があるので、同部の神経細胞はMCA閉塞後しばらくは瀕死の状態で生きていると考えられる。もちろん何の手だても施さなければ虚血巣周辺部（ischemic penumbra）でやがてアポトーシス様神経細胞死が起こり同部がすべて脳梗塞病変に様変わりすることは周知の事実である。臨床的にはこの虚血巣周辺部（ischemic penumbra）の神経細胞を救うことがもっとも大切であるが、このことを可能にならしむるほど強力に神経細胞保護作用を示す経口投与用医薬組成物は、発明者の知る限りこれまで皆無であった。

【0022】

本発明者らは、SH-SPラットのMCAを永久閉塞する1週間前より、MCA永久閉塞後4週間までコウジン末を経口投与しておく、同ラットの大脳皮質梗塞体積が非投与群の約1/4程度にまで縮小し、場所学習障害も有意に改善することを証明した。このことは、糖尿病、脳動脈硬化症、高血圧症、心房細動、等の基礎疾患を有する患者すなわち脳梗塞予備群と総称される患者や高齢者もしくは脳卒中既往歴を有する患者が、あらかじめコウジン末を服用しておけば、不

幸にして脳梗塞発作に見舞われた場合でも引き続きコウジン末を経口投与することにより、脳梗塞病変が著しく改善され脳血管性痴呆症も抑止されることを物語っている。さらにコウジン末の経口投与により脳梗塞病巣体積が非投与群の 1/4 程度に縮小したことは、同薬剤の経口投与が虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) における神経細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を顕著に抑止したことを明らかにするものである。

【0023】

一般に、神経細胞保護剤や保護因子は脳室内あるいは脳実質内に直接投与した場合にもっとも大きな効果を発揮し、静脈内投与や腹腔内投与をした場合には、脳血液関門に遮断されてその効果・効能が激減あるいは発現しないことがほとんどである。ましてや神経細胞保護剤や保護因子の経口投与となると、消化管での分解・吸収、血中への移行量・移行速度、血中での分解、脳血液関門での障壁、等、越えるべきハードルが山積みしている。最近ようやく、発明者（阪中、田中）は特願平 10-365560 号（ジンセノサイド Rb₁ からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）に記載されたごとく、優れた静脈内投与用神経細胞保護剤を発明することができたが、この静脈内投与用神経細胞保護剤（すなわちジンセノサイド Rb₁）ですら、単に経口投与しただけでは神経細胞保護作用を示さないことを最近発明者らは確認した。もちろん、ジンセノサイド Rb₁ でも、消化管での分解を阻止する担体あるいは消化管での吸収を促進する担体に混入・封入又は結合させたのちに、経口投与剤として使用できる可能性は残されているが、目下の所経口投与用神経細胞保護剤としてはコウジン末がその効果・効能を斟酌した場合、世界中でもっとも優れたものと思われる。発明者の知る限り、コウジン末は世界で唯一の優れた経口投与用神経細胞保護剤である。

【0024】

次に本発明者らは、MCA を永久閉塞した後にコウジン末の経口投与を開始してその効果をしらべた。MCA 永久閉塞の前後にコウジン末を経口投与した前述の実験において 0.9 g/kg/日の用量でコウジン末を投与したときにもっとも良好な結果が得られたので、本実験ではこの用量で実験を実施した。12~13 週齢の雄性 SH-SP ラット（体重 250~300 g）の左中大脳動脈皮質枝

(MCA) を吸入麻酔下で凝固・切離したのち、麻酔を終了した。同動物が麻酔から覚醒した後に、コウジン末を 0.9 g/kg /日の用量で1日単回32日間経口投与した。なお、MCAを閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）には、蒸留水のみを投与した。

【0025】

MCA永久閉塞後、発明者らの方法に従って (Zhang, B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998; Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253, 26-32, 1998)、2週目と4週目にそれぞれ4日間連続で水迷路テストを実施し、SH-SPラットの場所学習能力を判定した。

その結果を図5に示す。図5の上段は2週目の結果であり、同下段は4週目の結果である。また図5の白丸印は蒸留水投与虚血群、黒四角印はコウジン末 0.9 g/kg /日投与虚血群を示す。参考として、図1で用いた偽手術群の実験値を黒丸印で示す。

図5のごとくMCA永久閉塞後（脳梗塞後）の場所学習障害が、コウジン末 0.9 g/kg /日の虚血後経口投与で蒸留水注入虚血群に比べて有意に改善された。特に、MCA閉塞後4週目に良好な効果がみられた。なお、SH-SPラットの水泳速度には各群で有意差はみられなかった。

【0026】

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-SPラットを抱水クロラルにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する0.1モルリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率(%)を算出した。その結果を図6に示す。

図6に示されるごとく、コウジン末 0.9 g/kg /日投与虚血群で蒸留水投与虚血群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。しかしながら、その効果は、MCA永久閉塞前後にコウジン末を 0.9 g/kg /日の用量で投与した場合と比べて、弱いものであった。従って、コウジン末は脳梗塞が起こる前

から、服用（経口投与）し始め、不幸にして脳梗塞に見舞われても経口投与し続けることが肝要であると考えられる。もちろん、コウジン末をMCA永久閉塞後に経口投与した場合の効果は、ジンセノサイドRb₁をMCA永久閉塞後に静脈内投与した場合の効果に比べて（特願平10-365560号、ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）不十分であるが、ジンセノサイドRb₁のような速効性のある静脈内投与製剤が普及していないことを考えると、コウジン末の経口投与を脳梗塞発症後に開始することも次善の策として可能と思われる。

【0027】

医療機関でのみ可能な薬物の静脈内投与や点滴静注に比べて、少なくともコウジン末の経口投与は、いつでもどこでも脳梗塞患者の意識と嚥下機能が保持されている限り実施可能であるという利点を備えていると思われる。また、脳梗塞患者の意識や嚥下機能が芳しくないときには、胃管を挿入することにより長期的に医療機関のみならず在宅でも、コウジン末を投与できるので、その利用価値は極めて高いと思われる。また、コウジン末はすでに人類が数千年の長きにわたって服用している薬物であるので、その安全性も確立されていることを考えると、少なくともジンセノサイドRb₁の静脈内投与が一般臨床の場で適用されるまでは、急性期脳梗塞患者にコウジン末を速やかに経口投与することが重要かつ必須の治療上の選択肢となることを、本発明は明らかにするものである。

【0028】

次に、本発明者らはコウジン末の経口投与がどのようなメカニズムで神経細胞を保護するかを調べた。もしこの作用メカニズムが解明されればコウジン末の新たな効果・効能が発明されるものと期待される。このため、本発明者らは細胞死抑制遺伝子産物であるBcl-x_L蛋白に着目した。Bcl-x_L蛋白は神経組織、免疫系組織、循環系組織を始めとする多くの組織に発現しており、細胞が生存する上で重要な役割を担っていることが証明されている（Adams, J.M. and Cory, S. Science, 281, 1322-1326, 1998; Boise, L.H. et al., Cell, 74, 597-608, 1993; Gottschalk, A.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7350-7354, 1994; Gonzales-Garcia, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92

, 4304-4308, 1995)。

【0029】

そこで、本発明者らはコウジン末の経口投与が神経組織における Bcl-x_L 蛋白の発現を増加させるかどうか、スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いて調べた。本発明者らの既発表の論文において (Wen, T.-C. et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998)、本発明者らは一過性前脳虚血後の海馬 CA1 領域において Bcl-x_L 蛋白の発現量をしらべる実験系を確立しているので、この系を用いてコウジン末経口投与の効果を検討した。

ところで、図 7 に示すように、スナネズミに 5 分間の一過性前脳虚血を負荷する 1 週間前より 1 日単回、7 日間コウジン末を 0.9 g/kg/日又は 1.5 g/kg/日の用量で経口投与しておく、蒸留水投与虚血群に比べて海馬 CA1 領域の神経細胞死が有意に予防され、受動的回避学習実験の反応潜時も延長することを、本発明者の 1 人 (阪中) はすでに論文として発表している (Wen, T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996)。特にコウジン末 1.5 g/kg/日投与虚血群で 0.9 g/kg/日投与虚血群よりも良好な効果が見られるので、本実験ではコウジン末を 1.5 g/kg/日の用量で 5 分間の一過性前脳虚血を負荷する 1 週間前より 1 日単回 7 日間経口投与し、5 分虚血後さらにコウジン末を経口投与した。最後のコウジン末投与から 24 時間目に海馬 CA1 領域の組織を採取した。その後電気泳動用サンプル緩衝液で細胞を溶解し、電気泳動を実施した。泳動により分離された蛋白をさらにニトロセルロース膜に転写し、抗 Bcl-x_L 蛋白抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。偽手術動物ならびに 5 分間の一過性前脳虚血を負荷した対照動物 (虚血コントロール動物) には、同量の蒸留水のみを経口投与した。また、1.5 g/kg/日という高用量のコウジン末経口投与が、末梢臓器の Bcl-x_L 蛋白発現に影響を与えるかどうか調べるため、肝臓と脾臓を採取して、同様の手順でウエスタンブロッティングを実施した。以上の実験手順の詳細は発明者らの既報 (Wen, T.-C. et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998) に記述されている。結果を図 8 に示す。

また、抗 Bcl-x_L 蛋白抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した

。結果を図9に示す。

【0030】

図8に示すごとく、コウジン末を1.5 g/kg/日の用量でスナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷する1週間前より1日単回、7日間経口投与し虚血負荷直後にも同量のコウジン末を単回経口投与すると、24時間後海馬CA1領域におけるBcl-x_L蛋白発現量は、偽手術群ならびに蒸留水投与虚血群に比べて、全例で増加していた。この抗Bcl-x_L蛋白抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した結果、図9に示すごとくコウジン末の経口投与が海馬CA1領域におけるBcl-x_L蛋白発現量を有意に増加させることが判明した。しかし、このように高用量のコウジン末を経口投与しても肝臓や脾臓におけるBcl-x_L蛋白発現量は増加しなかった。

【0031】

発明者らは次に、低用量のコウジン末を1週間よりも長期にわたり経口投与すれば海馬CA1領域におけるBcl-x_L蛋白の発現量が増加するかどうかしらべた。このため、たとえば200 mg/kg/日の用量で、スナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷する4週間前より1日単回経口投与し、5分虚血直後にさらに単回経口投与した。24時間後に海馬CA1領域を採取し、図8に示した実験同様抗Bcl-x_L蛋白抗体によるウエスタンブロッティングを実施した。偽手術動物ならびに5分間の一過性前脳虚血を負荷した対照動物（虚血コントロール動物）には、同量の蒸留水のみを経口投与した。また、200 mg/kg/日のコウジン末経口投与が、末梢臓器のBcl-x_L蛋白発現に影響を与えるかどうか調べるため、肝臓と脾臓を採取して、同様の手順でウエスタンブロッティングを実施した。

【0032】

しかしながら、コウジン末を200 mg/kg/日の用量で4週間経口投与しても海馬CA1領域におけるBcl-x_L蛋白の発現量には有意な増加は認められなかった。また、200 mg/kg/日の用量でコウジン末を5分虚血前4週間、1日単回経口投与し、さらに5分虚血後同じ要領で1週間コウジン末を経口投与しても、スナネズミの受動的回避学習障害ならびに海馬CA1領域の神経細

胞死は軽減されなかった。このことは、低用量のコウジン末経口投与により $Bc1-x_L$ 蛋白の発現量の増加が誘導されなければ、神経細胞保護効果もみられないことを物語っている。言い換えれば、 1.5 g/kg/日 という高用量のコウジン末をスナネズミに 1 週間程度経口投与した結果、図 8 のごとく海馬 CA1 領域における $Bc1-x_L$ 蛋白の発現量が増加し、図 7 に示すごとく同領域における虚血性神経細胞死が軽減されたと考えられる。脳室内投与で海馬 CA1 領域の $Bc1-x_L$ 蛋白量を増加せしめることにより、同領域の神経細胞を保護する生理活性物質として、本発明者らはインターロイキン 3 を同定しているが (Wen, T.-C. et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998)、経口投与により同様の作用を有する薬剤は本発明者の知る限りコウジン末が世界で唯一のものである。おそらく、MCA を永久閉塞された動物の虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) でも、コウジン末をあらかじめ経口投与することにより同部での $Bc1-x_L$ 発現量が増加して、脳梗塞巣が縮小したと思われる。ただし、MCA を永久閉塞したラットの虚血巣周辺部における $Bc1-x_L$ 蛋白発現量を増加させるのに必要なコウジン末投与はスナネズミの場合より少量であり、図 2 の結果から推測すると $0.75 \sim 1.2\text{ g/kg/日}$ と思われる。

【0033】

前述のごとく、スナネズミと SH-SP ラットでは、神経細胞死を抑止するのに必要なコウジン末投与量は異なることにも注意する必要がある。体重 75 g 程度のスナネズミでは明らかに 1.5 g/kg/日 のコウジン末経口投与が、神経細胞を虚血侵襲から効果的に保護すると考えられるが、体重 300 g 程度の SH-SP ラットでは明らかに 0.9 g/kg/日 のコウジン末経口投与量が 1.2 g/kg/日 のコウジン末投与量よりも、良好な神経細胞保護効果を示すことが図 2 から読みとれる。従って、動物の体重が増加するのに逆比例して、神経細胞保護作用を発揮するために必要なコウジン末の至適投与量は減少するものと考えられる。このことは、ヒトの場合にもあてはまる。例えば、体重 60 kg の成人に投与するある薬物の量を 1 とすると、体重 3 kg の新生児に投与する同薬物の量は一般にその 7 分の 1 になる。すなわち体重 1 kg あたりの薬物投与量は新生児の場合、成人の約 3 倍になるのである。このことから類推すると、新生児より

さらに体重が少ないSH-SPラットやスナネズミでは、体重1kgあたりの薬物投与量は新生児の1.5倍程度にはなると考えられる。すなわち、体重1kgあたりのコウジン末投与量は、SH-SPラットやスナネズミの場合、少なくともヒトの4倍程度に増えるものと考えられる。

【0034】

ところで、図2の結果によれば、MCAを永久閉塞されたSH-SPラットの大脳皮質梗塞巣は、コウジン末を0.75~1.2g/kg/日の用量でMCA閉塞前後に投与することにより有意に改善される。従って体重60kgのヒトに対しては、コウジン末として0.185~0.3g/kg/日の用量で、同様の効果が期待されることになる。おそらく、体重60kgのヒトの脳細胞（グリア細胞を含む）又は神経細胞の保護のために必要なコウジン末の投与量としては、患者の個人差や病状にもよるが、1日あたり2.0g~90g、好ましくは5.625g~36g、より好ましくは11.25g~18gとなる。また、これと同量のコウジン末から抽出したコウジンエキス（紅蔘エキス）ならびに粗サポニン分画を経口投与しても同様の脳細胞又は神経細胞保護効果が期待される。さらに粗サポニン分画に関しては、経口投与剤としてのみならず、静脈内投与剤、点鼻薬、吸入薬、舌下錠、坐薬、局所注入剤、皮膚外用剤、局所塗布剤、筋内注射薬、皮内注射薬、皮下注射薬としても使用可能である。特に静脈内投与剤として粗サポニン分画を使用する際には、経口投与の場合よりも量を少なくする必要がある。また、使用するコウジン末としては、韓国煙草人蔘公社製のオタネニンジン6年根から調整したものが好ましいが、成分が類似しているものであればあるいは一定量以上の神経細胞保護成分を含有しているものであれば、その他任意の産地由来のコウジン末や白蔘を経口投与しても神経細胞保護効果が得られるものと推測される。

【0035】

前述のごとく、200mg/kg/日の用量でコウジン末を、スナネズミに脳虚血を負荷する前に4週間経口投与しても、海馬CA1領域でのBcl-x_L蛋白発現量は増加しなかったが、同量のコウジン末を同様のスケジュールで経口投与すると、図10および図11に示すごとく肝臓や脾臓におけるBcl-x_L蛋白

白の発現量が有意に増加した。スナネズミにおいて 200 mg/kg/day のコウジン末投与により、肝臓や脾臓で Bcl-x_L 蛋白発現量が増加したことより、前記の体重 1 kg あたりの投与量算出理論を適用すれば、体重 60 kg のヒトではおよそ 50 mg/kg/day のコウジン末投与で肝臓及び脾臓での Bcl-x_L 蛋白発現量が増加することが予想される。すなわち体重 60 kg のヒトの肝臓および脾臓での Bcl-x_L 蛋白発現を増強するために必要なコウジン末の投与量としては、個人差にもよるが、1日あたり $0.6 \text{ g} \sim 15 \text{ g}$ 、好ましくは $1.5 \text{ g} \sim 6 \text{ g}$ 、より好ましくは $2 \text{ g} \sim 4 \text{ g}$ と考えられる。また、これと同量のコウジン末から抽出したコウジンエキス（紅蔘エキス）ならびに粗サポニン分画を経口投与しても同様に末梢臓器での Bcl-x_L 蛋白発現量が増加するものと考えられる。さらに、粗サポニン分画に関しては経口投与剤としてのみならず、静脈内投与剤、点鼻薬、吸入薬、舌下錠、坐薬、局所注入剤、皮膚外用剤、局所塗布剤、筋肉注射薬、皮内注射薬、皮下注射薬としても使用可能である。特に静脈内投与剤として粗サポニン分画を使用する際には、経口投与の場合よりも量を少なくする必要がある。

【0036】

このように、高用量のコウジン末経口投与により脳細胞又は神経細胞における Bcl-x_L 蛋白の発現量が増加し、神経細胞保護効果が発揮され、低用量のコウジン末経口投与により肝臓、脾臓を始めとする末梢臓器で Bcl-x_L 蛋白発現量が増加するのが本発明の特徴である。これまで、神経組織における Bcl-x_L 蛋白の発現量を増加せしめる物質として、インターロイキン3とジンセノサイド Rb_1 本発明者らは同定しているが（Wen, T.-C. et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998；特願平 10-365560号、ジンセノサイド Rb_1 からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）、経口投与により脳細胞もしくは神経細胞の Bcl-x_L 蛋白発現量を増加させる薬剤としては、高用量のコウジン末が世界で唯一のものである。薬用人蔘成分ジンセノサイド Rb_1 そのものの経口投与は神経細胞保護作用を示さないので、脳の Bcl-x_L 蛋白発現量を増加せしめることはまず有り得ないと考えられる。もちろん、脳室内投与したときのみ脳における Bcl-x_L 蛋白発現量を増加せしめ、神経細胞保護作用を示すインターロイ

キン3もペプチドであるが故に、消化管ですぐに分解され、しかも脳血液関門を通過できないので、経口投与により神経細胞保護効果を発揮するとは思えない。

【0037】

さて、高用量のコウジン末経口投与が肝臓・脾臓の $Bc1-x_L$ 蛋白発現量には影響を与えなかったことは、生体の恒常性を維持する上で非常に重要なことと思われる。すなわち、高用量のコウジン末を経口投与することによりコウジン末に含まれる $Bc1-x_L$ 蛋白発現促進成分が過剰に消化管から吸収され、血液循環を介して肝臓・脾臓を始めとする末梢臓器に到達するが、このような末梢臓器ではたとえ一時期 $Bc1-x_L$ 蛋白発現量が増加しても、その後速やかに $Bc1-x_L$ 蛋白発現量がダウンレギュレーション (down-regulation) されて $Bc1-x_L$ 蛋白量がコントロール値に戻るものと思われる。あるいは、高用量のコウジン末を経口投与しても、末梢臓器における $Bc1-x_L$ 蛋白発現増加はまったく起こらない可能性も充分あると思われる。従って、生体がある一定量のコウジン末経口投与に対してのみ、反応するということは、コウジン末をヒトに大量投与あるいは長期投与しても副作用がほとんど認められないことを支持するものである。また、コウジン末を低用量であれ高用量であれ、経口投与した際には、消化管の上皮組織は高濃度の $Bc1-x_L$ 蛋白発現促進成分に暴露されるはずであるが、これまでコウジン末を経口投与したヒトにおいて消化器癌等が高頻度で発症するという報告もなく、もちろん消化器系副作用出現の報告もほとんどみられない。一方、高用量のコウジン末を経口投与することにより血中に過剰の $Bc1-x_L$ 蛋白発現促進成分が流れても、脳血液関門を通過できる $Bc1-x_L$ 蛋白発現促進成分はそのうちのごく一部になると思われるので、脳に関しては高用量のコウジン末を経口投与したときのみ至適量の $Bc1-x_L$ 蛋白発現促進成分が神経細胞又は脳細胞に到達し、同細胞における $Bc1-x_L$ 蛋白の発現量が増加するものと思われる。

【0038】

また、逆に低用量のコウジン末を経口投与したときには、 $Bc1-x_L$ 蛋白発現促進成分は高用量のコウジン末を経口投与した場合に比べて、少量血中に移行するため、おそらくこの至適濃度の $Bc1-x_L$ 発現促進成分が肝臓・脾臓を始

めとする末梢臓器の $Bc1-x_L$ 蛋白を増加せしめるものと考えられる。しかし、低用量のコウジン末を経口投与しても、 $Bc1-x_L$ 蛋白発現促進成分の血中濃度はそれほど高くないので、脳血液関門を通過して脳に到達する同成分が不足するため、脳内の $Bc1-x_L$ 蛋白量は増加せず神経細胞保護効果もみられなくなると推測される。

このように生理活性物質あるいは薬剤がある一定の細胞外液濃度で存在するときのみ、細胞に作用するという概念はすでに生命科学領域で定着しつつあるものと発明者らは考えている。エリスロポエチンを例にとってこのことをもう少し詳しく説明すると、発明者の一人（阪中）は脳室内投与されたエリスロポエチンの1日量が2.5ユニットから25ユニットの範囲内であるときのみ、海馬CA1錐体神経細胞の保護作用が発揮され、エリスロポエチンの1日投与量がそれよりも多くてもあるいは少なくとも神経細胞保護作用がみられないことをすでに公表している（Sakanaka, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4635-4640, 1998）。

【0039】

コウジン末中に含まれる $Bc1-x_L$ 蛋白発現促進成分の候補として、粗サポニン分画の各種精製サポニン、非サポニン分画が考えられる。粗サポニン分画に含まれる精製サポニン（プロトパナキサジオール系サポニン、プロトパナキサトリオール系サポニン、オレアノール酸系サポニン）については庄司の著書（庄司順三、薬用人参サポニンの化学、pp251-261、薬用人参'95、熊谷朗編、1994、共立出版）に既述されている。プロトパナキサジオール系サポニンの代表であるジンセノサイド Rb_1 はコウジン末1g中に約4mg前後含有されているが、もしコウジン末として経口投与することにより、ジンセノサイド Rb_1 の消化管での分解が抑止されるか、あるいはジンセノサイド Rb_1 の消化管での吸収が促進された結果、測定感度以下のジンセノサイド Rb_1 がわずかながらも血中に移行するのであれば、ジンセノサイド Rb_1 も $Bc1-x_L$ 蛋白発現促進成分の1つとして挙げられる。ただ、コウジン末を経口投与してもジンセノサイド Rb_1 は血中に検出されないといわれており、さらにジンセノサイド Rb_1 自体を経口投与しても血清中や各臓器にジンセノサイド Rb_1 は検出されな

いと報告されているので（赤尾光昭ら、The Ginseng Review, 22, 97-102, 1996）、ジンセノサイドRb₁自体の経口投与が神経組織や末梢臓器でBcl-x_L蛋白発現を促進する可能性はまずないと思われる。事実、これまでの報告によればジンセノサイドRb₁自体を経口投与しても、何ら生理作用は認められないし、本発明者らもジンセノサイドRb₁の経口投与では神経細胞保護作用も認められないことをすでに確認している。従って、特願平10-365560号（ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護効果）にも既述したごとく、ジンセノサイドRb₁が神経細胞保護作用を発揮するためには、血中にある一定濃度以上存在する必要があると思われる。

【0040】

ミトコンドリア関連タンパクであるBcl-x_LはApaf1と結合することにより、Apaf1とプロカスパーゼ9（procaspase 9）との結合を阻害するといわれている（Adams, J. M. and Cory, S., Science, 281, 1322-1326, 1998）。Bcl-x_L蛋白の減少あるいは機能低下が起きると、Apaf1がBcl-x_L蛋白から解離し、ミトコンドリアからのチトクロームCの漏出とあいまって、プロカスパーゼ9が活性化されると考えられている（Adams, J. M. and Cory, S., Science, 281, 1322-1326, 1998）。ひとたび細胞質内のプロカスパーゼ9が活性化されると引き続いてカスパーゼ9（caspase 9）ならびにカスパーゼ3（caspase 3）が活性化され、これらの蛋白分解酵素により細胞は自己融解し、死（アポトーシス）に至る過程が加速される。おそらく、プロカスパーゼ9が活性化された段階で、細胞が死に至る運命が決定される可能性が高いので、経口投与用Bcl-x_L蛋白発現増強剤（コウジン末）によりプロカスパーゼ9の活性化をくい止めることが、細胞死を防ぐための得策と考えられる。

【0041】

さて、発明者の一人（阪中）はスナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷した後に1週間、コウジン末を経口投与しても海馬CA1領域の神経細胞は保護されないことを発表している（Wen, T.-C., et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996）、コウジン末をヒト一過性脳虚血発作の治療や処置に実用化することは困難であると1996年当時判断していた。しかし、本発明では、スナネ

ズミの一過性前脳虚血発作よりも重篤でかつヒト脳梗塞の病態を反映するMCA永久閉塞SH-SPラットにおいて、コウジン末をMCA永久閉塞後から4週間程度経口投与すると図5、図6に示すごとく場所学習障害の改善と脳梗塞巣の縮小が認められた。従って、本発明により、脳梗塞後にコウジン末を4週間程度経口投与すれば脳梗塞治療効果が発揮されることが明らかにされた。

従って、スナネズミの一過性前脳虚血モデルでも、虚血後4週間程度コウジン末を経口投与すれば海馬CA1領域の神経細胞保護効果が認められるかも知れないと本発明者らは推測した。しかしながら、スナネズミの5分間前脳虚血モデルでは、虚血後1週間以内に海馬CA1領域の神経細胞がほとんどすべて死に至ってしまうので、4週間にわたるコウジン末経口投与の効果を判定するには、このモデルは不適当と考えられた。そこで、本発明者らはスナネズミの3分間前脳虚血モデルを用いて、コウジン末を4週間経口投与したときの効果を判定することにした。

【0042】

スナネズミの脳温を $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ に維持した状態で3分間両側総頸動脈の血流を遮断し、再灌流させると、1週間後に海馬CA1領域の神経細胞が約半数死に至ることを発明者の一人(阪中)はすでに発表している(Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Sci. Acad. USA, 95, 4635-4640, 1998)。しかも、この時点で生存していると考えられる海馬CA1領域の神経細胞において、アポトーシス様細胞死の指標であるDNAの断片化がさらに進行中であることが、TUNEL染色法により発明者らは確認している(Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998; Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998)。従って、3分間の一過性前脳虚血を負荷されたスナネズミの海馬CA1領域では、5分間虚血を負荷した場合と異なり、虚血後1週目以降も神経細胞変性が進行することが明らかにされている。本発明者らは、このように比較的長期にわたって神経細胞死が進行する3分間の一過性前脳虚血モデルを用いて、コウジン末を虚血後4週間経口投与したときの効果をしらべた。

【0043】

発明者らの方法に準じて(Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U

SA, 95, 4635-4640, 1998; Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998; Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998)、吸入麻酔下でスナネズミの脳温を $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ に維持しながら両側総頸動脈血流を3分間遮断した。同動物が麻酔から覚醒したのちに、コウジン末を 1.5 g/kg/日 の用量で1日単回28日間経口投与した。偽手術動物と3分間の前脳虚血を負荷した対照動物（虚血コントロール動物）には、同量の蒸留水のみを経口投与した。その後、ステップダウン型受動的回避学習実験を実施し、次いで同動物をペントバルビタール麻酔下で4%パラホルムアルデヒド及び2.5%グルタルアルデヒド含有リン酸緩衝液を用いて経心的に灌流固定した。脳を摘出したのち、パラフィンに包埋し、 $5\text{ }\mu\text{m}$ の厚みのパラフィン切片を作成した。各動物の海馬CA1領域1mmあたりの神経細胞密度を発明者らの方法により計測した (Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4635-4640, 1998; Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998; Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998)。以下に前掲の論文で記述したステップダウン型受動的回避学習実験の概略を記述する。

3分虚血後28日目にスナネズミを受動的回避学習実験装置の安全域（プラットホーム）に置くと、当初スナネズミは何度か下のグリッド部に降りるが、その都度電撃刺激を受けて安全域に戻る。5分間の訓練施行中に、多くのスナネズミは安全域にとどまるようになる。24時間後、グリッド部の電源を切った状態で、再びスナネズミを安全域に置き、グリッド部に降りるまでの時間（反応潜時）を測定して、同動物の学習能力の指標とした。

【0044】

結果を図12、図13に示す。図12の(A)は受動的回避学習実験の反応潜時を、図12の(B)は海馬CA1領域1mmあたりの神経細胞密度を示す。図12(A)に示すごとく、コウジン末を3分虚血後4週間経口投与すると、受動的回避学習実験の反応潜時が蒸留水投与虚血群に比べて有意に延長した。また、図12(B)に示すごとくコウジン末の経口投与により、海馬CA1領域の神経細胞密度も蒸留水投与虚血群に比べて有意に増加していた。

図13の(A)は偽手術動物、(B)は蒸留水投与虚血動物、(C)はコウジ

ン末経口投与虚血動物の、海馬CA1領域の光学顕微鏡像をそれぞれ示す。図13に示すごとく、偽手術動物(A)に比べて、蒸留水投与虚血動物では(B)3分虚血後、1週間目以後も神経細胞がさらに変性脱落し(死に至り)、虚血後1週間に生存していた正常の2分の1程度の海馬CA1神経細胞が、虚血後28日目にはさらに正常の4分の1前後まで減少することがわかった。しかし、コウジン末を3分虚血負荷後から28日間経口投与しておく(C)、虚血後一週間目から28日目までに起こる神経細胞死が有意に抑止されることが判明した。

【0045】

従って、3分間虚血という比較的軽い脳虚血負荷でも脳の神経細胞は徐々に死に至り、生体の高次神経機能が損なわれることを本モデル動物は示している。このモデル動物と類似した神経細胞の長期変性とも言うべき現象は、軽症の一過性脳虚血発作・脳梗塞・脳出血・クモ膜下出血発作を経験した患者、一酸化炭素中毒患者、神経変性疾患を有する患者にもみられることがある。これらの患者に共通する特徴は、当初高次神経機能障害が比較的軽微であっても、時間を経るにつれて、脳において神経細胞死がゆっくりと進行するため、高次神経機能障害が重症化するということである。Bcl-x_L 蛋白発現増強作用を有するコウジン末を3分虚血後に経口投与しておく、緩徐に進行する海馬CA1神経細胞変性が抑止されるという実験事実は、高用量のコウジン末経口投与が前記の患者の治療に有効であるということを物語っている。

【0046】

以上の実験結果から、コウジン末からなる経口投与用Bcl-x_L 発現増強剤が、高用量では脳血管性痴呆、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作、神経変性疾患、脳性マヒ、脊髄損傷などの脳・神経疾患の治療、予防又は処置に有効であることが明らかにされた。

また、低用量のコウジン末を経口投与することにより、肝臓・脾臓を始めとする末梢臓器において細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x_L 蛋白の発現が増強されることもわかった。従って、低用量のコウジン末経口投与は、細胞死を伴う末梢臓器の疾病(心筋症、心不全、心筋梗塞、心筋炎、肝・腎・心虚血再灌流障害、肝炎、腎炎、糖尿病、免疫不全病、褥創、等)の治療・予防・処置にも有効である

ことが分かった。

一方、本発明で使用するコウジン末は、副作用の極めて少ない物質として知られている。

【0047】

【実施例】

次に、具体的な試験例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

【0048】

実施例 1 (コウジン末の脳梗塞前後経口投与実験)

12～13週齢の雄性SH-SPラット(体重250～300g)を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。同動物の左中大脳動脈皮質枝(MCA)を発明者らの論文に記載した方法を用いて吸入麻酔下で凝固、切離した(Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253, 26-32, 1998)。コウジン末を蒸留水に混入し、MCA永久閉塞前1週間、MCA永久閉塞後32日間、1日単回経口投与した(0.6g/kg/日、0.75g/kg/日、0.9g/kg/日、または1.2g/kg/日、各群n=5-8)。

なお、MCAを閉塞した対照動物(虚血コントロール動物)と、偽手術をした動物には同量の蒸留水のみを経口投与した。

【0049】

MCA永久閉塞後、発明者らの方法に従って(Zang, B., et al., J Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998; Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253, 26-32, 1998)、2週目と4週目にそれぞれ4日間連続で水迷路テストを実施し、SH-SPラットの場所学習能力を判定した。

その結果を図1に示す。図1の上側は2週目の結果であり、同下側は4週目の結果である。また図1中の白丸印は蒸留水投与虚血群、黒丸印は偽手術群、白四角印はコウジン末0.6g/kg/日投与虚血群、黒四角印はコウジン末0.7

5 g/kg/日投与虚血群、白三角印はコウジン末 0.9 g/kg/日投与虚血群、黒三角印はコウジン末 1.2 g/kg/日投与虚血群を示す。

図 1 のごとく MCA 永久閉塞後（脳梗塞後）の場所学習障害が、蒸留水投与虚血群に比べて、コウジン末 0.75 g/kg/日投与虚血群で有意に改善された。特にコウジン末 0.9 g/kg/日投与虚血群でもっとも良好な効果がみられた。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法は ANOVA + Fisher の PLSD によっている。なお、SH-SP ラットの泳速度には各群で有意差はみられなかった。

【0050】

4 週目の水迷路テスト終了後に、SH-SP ラットを抱水クロラルにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する 0.1 モルリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率(%)を算出した。その結果を図 2 に示す。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法は Mann-Whitney U テストによっている。

図 2 に示されるごとく、コウジン末 0.75~1.2 g/kg/日投与虚血群で蒸留水投与虚血群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。特にコウジン末 0.9 g/kg/日投与虚血群で、最も効果が強く、大脳皮質梗塞比率の平均値が蒸留水投与虚血群の 2 分の 1 以下に減少していた。このことから、実際の脳梗塞体積は、コウジン末 0.9 g/kg/日の経口投与により約 4 分の 1 程度に縮小したことになる。

【0051】

図 3 上段に蒸留水投与虚血群の脳梗塞巣（4 例）、図 3 下段にコウジン末 0.9 g/kg/日投与虚血群の脳梗塞巣（4 例）を示す。

また図 4 に本実験結果をまとめた模式図を示す。蒸留水投与虚血群では脳梗塞病巣部が大きく、水迷路テストにおいて目的のプラットホームに到達するまでに長時間を要しているのに対して、コウジン末投与虚血群においては病巣部が縮小しており、この結果水迷路テストにおいて目的のプラットホームに短時間で到達している。

【0052】

実施例 2 (コウジン末の脳梗塞後経口投与実験)

12～13週齢の雄性SH-SPラット(体重250～300g)の左中大脳動脈皮質(MCA)を吸入麻酔下で凝固・切離した後に、コウジン末を0.9g/kg/日の用量で1日単回32日間経口投与した(n=7)。なお、MCAを閉塞した対照動物(虚血コントロール動物)には、蒸留水のみを投与した(n=8)。

【0053】

MCA永久閉塞後、発明者らの方法に従って(Zang, B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998; Igase, K., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Sadamoto, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253, 26-32, 1998)、2週目と4週目にそれぞれ4日間連続で水迷路テストを実施し、SH-SPラットの場合学習能力を判定した。

その結果を図5に示す。図5の上段は2週目の結果であり、同下段は4週目の結果である。また図5の白丸印は蒸留水投与虚血群(n=8)、黒四角印はコウジン末0.9g/kg/日投与虚血群(n=8)を示す。参考として、図1で用いた偽手術群の実験値を黒丸印で示す。

図5のごとくMCA永久閉塞後(脳梗塞後)の場所学習障害が、コウジン末0.9g/kg/日の虚血後経口投与で蒸留水注入虚血群に比べて有意に改善された。特に、MCA閉塞後4週目に良好な効果がみられた。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はANOVA+ FisherのPLSDによっている。

【0054】

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-SPラットを抱水クロラルにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する0.1モルリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率(%)を算出した。その結果を図6に示す。データは平均値±標準誤差で示されてお

り、統計解析法はMann-Whitney Uテストによっている。

図6に示されるごとく、コウジン末0.9g/kg/日投与虚血群で蒸留水投与虚血群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。

【0055】

実施例3（高用量コウジン末による神経組織内Bcl-x_L蛋白発現増強作用解析実験）

コウジン末の経口投与が神経組織におけるBcl-x_L蛋白の発現を増加させるかどうか、スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いて調べた。本発明者らの既発表の論文において（Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998）、本発明者らは一過性前脳虚血後の海馬CA1領域においてBcl-x_L蛋白の発現量をしらべる実験系を確立しているので、この系を用いてコウジン末経口投与の効果を検討した。

ところで、図7に示すように、スナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷する1週間前より1日単回、7日間コウジン末を0.9g/kg/日又は1.5g/kg/日の用量で経口投与しておく、蒸留水投与虚血群に比べて海馬CA1領域の神経細胞死が有意に予防され、受動的回避学習実験の反応潜時も延長することを、本発明者の1人（阪中）はすでに論文として発表している（Wen, T.-C., et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996）。特に、コウジン末1.5g/kg/日投与虚血群で0.9g/kg/日投与虚血群よりも良好な効果が見られるので、本実験ではコウジン末を1.5g/kg/日の用量で、5分間の一過性前脳虚血を負荷する1週間前より1日単回7日間経口投与し、5分間虚血後さらにコウジン末を経口投与した（n=4）。最後のコウジン末投与から24時間目に海馬CA1領域の組織を採取した。その後電気泳動用サンプル緩衝液で細胞を溶解し、電気泳動を実施した。泳動により分離された蛋白をさらにニトロセルロース膜に転写し、抗Bcl-x_L蛋白抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。偽手術動物（n=4）ならびに5分間の一過性前脳虚血を負荷した対照動物（虚血コントロール動物、n=4）には、同量の蒸留水のみを経口投与した。また、1.5g/kg/日という高用量のコウジン末経口投与が、末梢臓器のBcl-x_L蛋白発現に影響を与えるかどうかしらべるため、肝臓と脾臓を採

取して、同様の手順でウエスタンブロッティングを実施した。以上の実験手順の詳細は発明者らの既報 (Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998) に記述されている。結果を図 8 に示す。

また、抗 B c l - x_L 蛋白抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した。結果を図 9 に示す。

【0056】

図 8 に示すごとく、コウジン末を 1.5 g/kg/日の用量でスナネズミに 5 分間の一過性前脳虚血を負荷する 1 週間前より 1 日単回、7 日間経口投与し虚血負荷直後にも同量のコウジン末を単回経口投与すると、24 時間後海馬 C A 1 領域における B c l - x_L 蛋白発現量は、偽手術群ならびに蒸留水投与虚血群に比べて、全例で増加していた。この抗 B c l - x_L 蛋白抗体と反応するバンドを画像解析装置で定量化した結果、図 9 に示すごとく、コウジン末の経口投与が海馬 C A 1 領域における B c l - x_L 蛋白発現量を有意に増加させることが判明した。しかし、このような高用量のコウジン末を経口投与しても肝臓や脾臓における B c l - x_L 蛋白発現量は増加しなかった。統計解析法は A N O V A + S c h e f f e の post hoc test によっている。

【0057】

実施例 4 (低用量コウジン末経口投与による肝臓・脾臓内 B c l - x_L 蛋白発現増強作用解析実験)

発明者らは次に、低用量のコウジン末を 1 週間よりも長期にわたり経口投与すれば海馬 C A 1 領域における B c l - x_L 蛋白発現量が増加するかどうかしらべた。このため、たとえば 200 mg/kg/日の用量で、スナネズミに 5 分間の一過性前脳虚血を負荷する 4 週間前より 1 日単回経口投与し、5 分間虚血直後にさらに単回経口投与した (n = 4)。24 時間後に海馬 C A 1 領域を採取し、図 8 に示した実験同様抗 B c l - x_L 蛋白抗体によるウエスタンブロッティングを実施した。偽手術動物ならびに 5 分間の一過性前脳虚血を負荷した対照動物 (虚血コントロール動物) には、同量の蒸留水のみを経口投与した (各群 n = 4)。また、200 mg/kg/日のコウジン末経口投与が、末梢臓器の B c l - x_L 蛋白発現に影響を与えるかどうかしらべるため、肝臓と脾臓を採取して、同様の

手順でウェスタンブロッティングを実施した（各群 $n = 4$ ）。

【0058】

しかしながらコウジン末を 200 mg/kg の用量で4週間経口投与しても海馬CA1領域における Bcl-x_L 蛋白の発現量には有意な増加は認められなかった。また、 200 mg/kg の用量でコウジン末を5分虚血前4週間、1日単回経口投与し、さらに5分虚血後同じ用量で一週間コウジン末を経口投与しても、スナネズミの受動的回避学習障害ならびに海馬CA1領域の神経細胞死は軽減されなかった。このことは低用量のコウジン末経口投与により Bcl-x_L 蛋白発現量の増加が誘導されなければ、神経細胞保護効果も見られないことを物語っている。

【0059】

前述のごとく、 200 mg/kg の用量でコウジン末を、スナネズミに脳虚血を負荷する前に4週間経口投与しても、海馬CA1領域での Bcl-x_L 蛋白発現量は増加しなかったが同量のコウジン末を同様のスケジュールで経口投与すると、図10および図11に示すごとく肝臓や脾臓における Bcl-x_L 蛋白発現量が有意に増加した。統計解析法はANOVA + Schefféのpost hoc testによっている。

【0060】

実施例5（高用量コウジン末の経口投与による海馬CA1神経細胞の長期変性抑止効果）

スナネズミの脳温を $37^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$ に維持した状態で3分間両側総頸動脈の血流を遮断し、再灌流させると、1週間後に海馬CA1領域の神経細胞が約半数死に至ることを発明者の一人はすでに発表している（Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Acad. USA, 95, 4635-4640, 1998）。しかも、この時点で生存していると考えられる海馬CA1領域の神経細胞において、アポトーシス様細胞死の指標である核の断片化がさらに進行中であることが、TUNEL染色法により発明者らは確認している（Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998；Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998）。従って3分間の一過性前脳虚血を負荷されたスナネズミの海馬CA1領域では、5

分間虚血を負荷した場合と異なり、虚血後1週目以降も神経細胞変性が進行することが明らかにされている。本発明者らは、このように比較的長期にわたって神経細胞死が進行する3分間の一過性前脳虚血モデルを用いて、コウジン末を虚血後4週間経口投与したときの効果をしらべた。

【0061】

発明者らの方法に準じて (Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 95, 4635-4640, 1998; Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998; Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998)、吸入麻酔下でスナネズミの脳温を $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ に維持しながら両側総頸動脈血流を3分間遮断した。同動物が麻酔から覚醒したのちに、コウジン末を 1.5 g/kg/日 の用量で1日単回28日間経口投与した ($n=11$)。偽手術動物 ($n=12$) と3分間の前脳虚血を負荷した対照動物 (虚血コントロール動物) ($n=8$) には、同量の蒸留水のみを経口投与した。その後、ステップダウン型受動的回避学習実験を実施して、同動物をペントバルビタール麻酔下で4%パラホルムアルデヒド及び2.5%グルタルアルデヒド含有リン酸緩衝液を用いて経心的に灌流固定した。脳を摘出したのち、パラフィンに包埋し、 $5\mu\text{m}$ の厚みのパラフィン切片を作成した。各動物の海馬CA1領域1mmあたりの神経細胞密度を発明者らの方法により計測した (Sakanaka, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4635-4640, 1998; Wen, T.-C., et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998; Peng, H., et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18, 349-360, 1998)。以下に前掲の論文で記述したステップダウン型受動的回避学習実験の概略を記述する。

3分虚血後28日目にスナネズミを受動的回避学習実験装置の安全域 (プラットホーム) に置くと、当初スナネズミは何度か下のグリッド部に降りるが、その都度電撃刺激を受けて安全域に戻る。5分間の訓練施行中に、多くのスナネズミは安全域をとどまるようになる。24時間後、グリッド部の電源を切った状態で、再びスナネズミを安全域に置き、グリッド部に降りるまでの時間 (反応潜時) を測定して、同動物の学習能力の指標とした。

【0062】

結果を図12、図13に示す。図12の(A)は受動的回避学習実験の反応潜時を、図12の(B)は海馬CA1領域1mmあたりの神経細胞密度を示す。図12(A)に示すごとく、コウジン末を3分虚血後4週間経口投与すると、受動的回避学習実験の反応潜時が蒸留水投与虚血群に比べて有意に延長した。また、図12(B)に示すごとくコウジン末の経口投与により、海馬CA1領域の神経細胞密度も蒸留水投与虚血群に比べて有意に増加していた。

図13の(A)は偽手術動物、(B)は蒸留水投与虚血動物、(C)はコウジン末投与虚血動物の、海馬CA1領域の光学顕微鏡像をそれぞれ示す。図13に示すごとく、偽手術動物(A)に比べて、蒸留水投与虚血動物(B)では3分虚血後、1週間目以後も神経細胞がさらに変性脱落し(死に至り)、虚血後1週間に生存していた正常の2分の1程度の海馬CA1神経細胞が、虚血後28日目にはさらに正常の4分の1前後まで減少することがわかった。しかし、コウジン末を3分虚血負荷後から28日間経口投与しておく(C)、虚血後一週間目から28日目までに起こる神経細胞死が有意に抑止されることが判明した。

【0063】

実施例6 (コウジン末経口投与による舞踏病の治療、予防および処置)

舞踏病(ハンチントン病)は神経変性疾患の中でも代表的な単一遺伝子病として知られており、ポリグルタミンをコードするCAGのくり返し配列が病因であると考えられているが、その治療法はいまだ開発されていない。舞踏病の責任遺伝子であるミュータントハンチンチン(mutant huntingtin)を線状体由来の培養神経細胞に導入(transfection)すると、同細胞はアポトーシス様神経細胞死に陥る。しかし、ミュータントハンチンチン(mutant huntingtin)とともにBcl-x_L蛋白を培養神経細胞に強制発現しておく(C)、同細胞の死がほぼ完全に抑止されることが報告されている(Saudou, F., et al., Cell, 95, 55-66, 1998)。従って脳神経組織におけるBcl-x_L蛋白発現増強作用を有するコウジン末を、舞踏病発病前あるいは発病後に経口投与すれば、効果・効能を示す可能性が高い。また舞踏病以外のポリグルタミン病(Machado-Joseph病、dentatorubral-pallidoluysian atrophy、等)でもコウジン末の経口投与が有効と思われる。

遺伝子診断によって舞踏病あるいはその他のポリグルタミン病を将来発症することが判明したヒト（体重 60 kg と仮定）、あるいはすでにポリグルタミン病を発症した患者（体重 60 kg と仮定）に、コウジン末を 1 日あたり、2.0 g ～ 90 g、好ましくは 5.625 g ～ 36 g、より好ましくは 11.25 g ～ 18 g 経口投与する。舞踏病あるいはその他のポリグルタミン病発症以前からコウジン末を経口投与するときは不幸にして疾病が発症しても、コウジン末の経口投与を病状が改善するかあるいは安定するまで継続することが望ましい。また、舞踏病あるいはその他のポリグルタミン病を発症した患者にコウジン末を経口投与する場合には、病状が改善するかあるいは病状が安定するまでコウジン末の経口投与を継続する。

【0064】

実施例 7（コウジン末経口投与による拡張型心筋症の治療、予防および処置）

拡張型心筋症は原因の不明な心筋細胞死（心筋細胞変性）の結果、心機能の低下と心拡大を呈する疾患である。心機能低下は進行性に増悪し、心不全症状を発症し、死に至る。心不全が悪化したときには、心移植以外に治療法はないと考えられてきた。おそらく、拡張型心筋症患者の心筋細胞が死に至るときには、心筋細胞に豊富に含まれる細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x_L 蛋白が減少するものと推測されるので、この Bcl-x_L 蛋白の減少をコウジン末の経口投与によりくい止めることにより、同患者の心筋細胞死を先延ばしすることができ、ひいては同患者の心機能を長期にわたって維持することが可能になると思われる。

拡張型心筋症と診断された患者（体重 60 kg と仮定）に対して、速やかに正官庄コウジン末を 1 日あたり、0.6 g ～ 15 g、好ましくは 1.5 g ～ 6 g、より好ましくは 2 g ～ 4 g 連日経口投与する。経口投与は、病状が改善するかあるいは病状の進行がとまるまで継続することが好ましい。また、コウジン末の経口投与と、β-ブロッカー、カルシウム拮抗剤、ACE 阻害剤、アンギオテンシン受容体阻害薬等の内服と併用することも可能である。

【0065】

【発明の効果】

本発明は、比較的高用量のコウジン末の経口投与用製剤からなる有効な急性期

・慢性期の脳梗塞（脳血栓・脳塞栓）のみならず脳出血・クモ膜下出血の急性期や慢性期あるいは一過性脳虚血発作などに対する、脳・神経疾患の治療、予防剤および、神経細胞・神経組織保護薬を提供する。すなわち、本発明のコウジン末は脳卒中が疑われる患者に対して、患者の意識と嚥下機能が保持されている限り、在宅でも経口投与可能な薬物である。また、糖尿病、高血圧症、脳動脈硬化症、心房細動、脳動脈瘤等の基礎疾患を有する脳卒中予備軍とも言うべき高齢者もしくは脳卒中の既往を有する患者があらかじめコウジン末を服用しておくこと、万一不幸にして脳卒中発作に見舞われても、コウジン末を服用しつづけることにより脳卒中病巣や高次神経機能障害が、コウジン末非服用患者に比べて著しく抑制される。

また、本発明のコウジン末を比較的高用量経口投与することにより神経組織における細胞死抑制遺伝子産物すなわち Bcl-x_L 蛋白の発現が促進されること、ならびに比較的高用量のコウジン末経口投与が虚血巣周辺部（ischemic penumbra）におけるアポトーシス様神経細胞死を抑止することから判断すれば、本発明の比較的高用量のコウジン末からなる医薬組成物はアポトーシス様神経細胞死もしくはアポトーシスを伴う一次性・二次性神経変性疾患（アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、脱髄疾患、舞蹈病を始めとするポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、緑内障、老人性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、網膜中心動静脈閉塞症、網膜剥離、網膜色素変性症、エイズ脳症、肝性脳症、脳炎、脳性マヒ、頭部外傷、脊髄損傷、一酸化炭素中毒、新生児仮死、末梢神経障害、痙攣性対麻痺、進行性核上性麻痺、脊髄血管障害、ミトコンドリア脳筋症、髄膜炎等）などにも有効であるとされる。さらに本発明のコウジン末は、加齢に伴う脳神経細胞死に起因する諸症状（記憶力減退、振戦、筋力低下、作業能力低下、思考力低下、見当識減退、計算力低下、学習能力低下、意欲低下、動機付け低下、認知機能低下、そしゃく機能低下、言語機能低下、判断能力低下ならびにその他の高次脳神経機能低下）を改善する目的で、健康薬（OTC製剤）としても使用可能である。また、本発明の医薬組成物は副作用がほとんどなく、安全性の高い薬物を提供するものである。

【0066】

さて、細胞死抑制遺伝子産物 $Bcl-2$ は細胞を生かすための最後の砦とも言えるべき蛋白質であり、脳神経組織のみならず肝臓、脾臓、免疫系組織、循環系組織、皮膚を始めとする多くの末梢臓器・組織に分布して、細胞の生存を支持している。従って、低用量のコウジン末経口投与が肝臓・脾臓等の末梢臓器における $Bcl-2$ 蛋白発現量を増加させるという本実験結果は、低用量のコウジン末が細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の治療・予防・処置に有効であることを物語っている。このような細胞死を伴う末梢臓器・組織の疾病の中には、心筋・肝臓・腎臓の虚血再灌流障害、心筋症、心不全、心筋梗塞、狭心症、末梢循環不全、褥創、自己免疫病、免疫不全病、臓器移植後の拒絶反応、筋ジストロフィー、角膜損傷、放射線障害、感染症、膠原病、大動脈炎症候群、急性動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群、血栓性静脈炎、脾炎、肝炎、腎炎、糖尿病性腎症、糖尿病性心筋症、糖尿病、舌痛症、等が含まれる。また、本発明のコウジン末は、加齢に伴う免疫機能低下、循環機能低下、消化機能低下、性機能減退の諸症状を改善する目的で、健康薬としても使用可能である。

さらに、コウジン末から抽出した成分（紅蓼エキス（コウジンエキス）、粗サポニン分画、各種精製サポニン、非サポニン分画）及びそれらの代謝産物も、コウジン末と同様の効果・効能を示すものと期待される。

【0067】

また、コウジン末の脳細胞（神経細胞、グリア細胞等）保護成分をリード化合物として、新規細胞保護剤を開発することが可能になるのみならず、コウジン末の脳細胞保護成分の標的分子あるいは受容体を同定することにより、さらにそれらの機能を修飾・調節する新規化合物を合成することができる。これらコウジン末中の脳細胞保護成分の候補として、薬用人蔘の粗サポニン分画、ジンセノサイド Rb_1 を始めとする精製サポニン、薬用人蔘の非サポニン分画およびそれらの代謝産物が考えられることは“発明の詳細な説明”で記述した通りである。薬用人蔘中に含まれる精製サポニンやそれらの代謝産物を部分的に記述した文献として、庄司の著書（庄司順三、薬用人蔘サポニンの化学、薬用人蔘’95、熊谷朗編、pp251-261）と小橋の著書（小橋恭一ら、薬用人蔘の真の活性物質

は？、一消化管で和漢薬成分はすでに変化している一、薬用人参' 95、熊谷朗編、pp 213-221) があげられる。従って、本発明は上述のごとく細胞死を伴うあらゆる疾病の予防・治療・処置剤を開発する上で必須のものとなる。

さらに、コウジン末中の脳細胞保護成分、代謝産物あるいはコウジン末(薬用人参) そのものの細胞保護機構を解析することにより、細胞内情報伝達分子のうち、どの分子群が細胞の生死に関与するかが明らかにされ、それらの分子群の機能を促進または阻害する新規化合物を合成すれば、細胞死を伴う疾病のみならず悪性腫瘍の予防・治療・処置にも利用しうる薬剤が開発されるものと思われる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、MCA 永久閉塞前後に蒸留水又はコウジン末を経口投与されたラットの水迷路テストの結果を示す図である。図 1 の上側は 2 週目の結果であり、同下側は 4 週目の結果である。また図 1 中の白丸印は蒸留水投与虚血群、黒丸印は偽手術群、白四角印はコウジン末 0.6 g/kg/日投与虚血群、黒四角印はコウジン末 0.75 g/kg/日投与虚血群、白三角印はコウジン末 0.9 g/kg/日投与虚血群、黒三角印はコウジン末 1.2 g/kg/日投与虚血群を示す。

【図 2】

図 2 は、MCA 永久閉塞前後に蒸留水又はコウジン末を経口投与された動物の脳皮質梗塞比率を示す図である。

【図 3】

図 3 は、脳皮質梗塞巣の写真である。A が蒸留水投与虚血群 4 例、B がコウジン末 0.9 g/kg/日投与虚血群 4 例である。

【図 4】

図 4 は、実施例 1 の結果をまとめた模式図である。

【図 5】

図 5 は、MCA 永久閉塞後に蒸留水又はコウジン末を経口投与されたラットの水迷路テストの結果を示す図である。図 5 の上段は 2 週目の結果であり、同下段は 4 週目の結果である。また図 5 の白丸印は蒸留水投与虚血群、黒四角印はコウジン末 0.9 g/kg/日投与虚血群を示す。参考として、図 1 で用いた偽手術

群の実験値を黒丸印で示す。

【図6】

図6は、MCA永久閉塞後に蒸留水又はコウジン末0.9g/kg/日を経口投与されたラットの大脳皮質梗塞比率を示す。

【図7】

図7は、スナネズミに5分間の一過性前脳虚血を負荷する前に一週間1日単回コウジン末又は蒸留水を投与したときの、反応潜時と海馬CA1領域神経細胞密度を示す図である。上段(A)が受動的回避学習実験の反応潜時を、下段(B)が神経細胞密度を示す。偽手術群を白カラム、蒸留水投与虚血群を灰色カラム、コウジン末投与虚血群を黒カラム、で示す。

【図8】

図8は、偽手術動物、蒸留水経口投与虚血動物、コウジン末経口投与虚血動物(1.5g/kg/日)の海馬CA1領域におけるBcl-x_L蛋白質発現量を解析したウエスタンブロッティングの結果を示す、図面に代わる写真である。

【図9】

図9は、図8のウエスタンブロッティングの結果をデンストメトリーで定量化したグラフである。

【図10】

図10(A)は、蒸留水投与動物とコウジン末投与動物(200g/kg/日)の肝臓におけるBcl-x_L蛋白質発現量を解析したウエスタンブロッティングの結果を示す、図面に代わる写真である。

図10(B)は、図10(A)のウエスタンブロッティングの結果をデンストメトリーで定量化したグラフである。

【図11】

図11(A)は、蒸留水投与動物とコウジン末投与動物(200mg/kg/日)の脾臓におけるBcl-x_L蛋白質発現量を解析したウエスタンブロッティングの結果を示す、図面に代わる写真である。

図11(B)は、図11(A)のウエスタンブロッティングの結果をデンストメトリーで定量化したグラフである。

【図 12】

図 12 は、スナネズミに 3 分間の前脳虚血を負荷した後に、28 日間 1 日単回コウジン末又は蒸留水を投与したときの、反応潜時と海馬 CA1 領域神経細胞密度を示す図である。上段 (A) が受動的回避学習実験の反応潜時を、下段 (B) が神経細胞密度を示す。偽手術群を白カラム、蒸留水投与虚血群を灰色カラム、コウジン末投与虚血群を黒カラム、で示す。

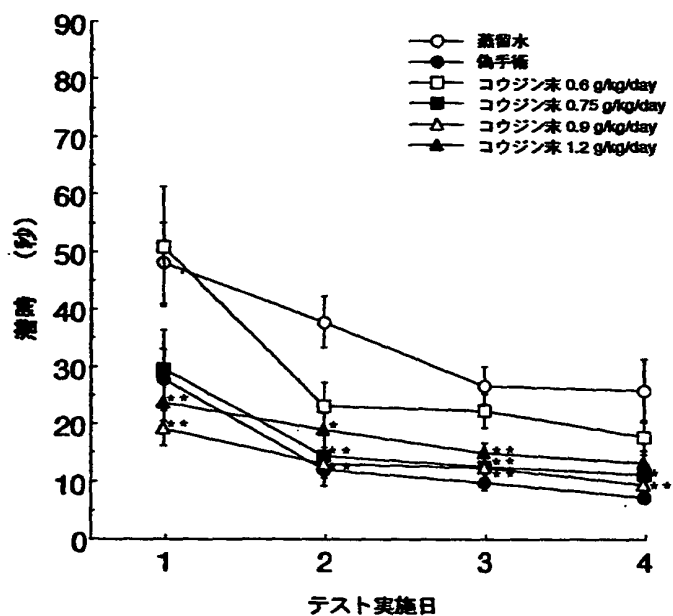
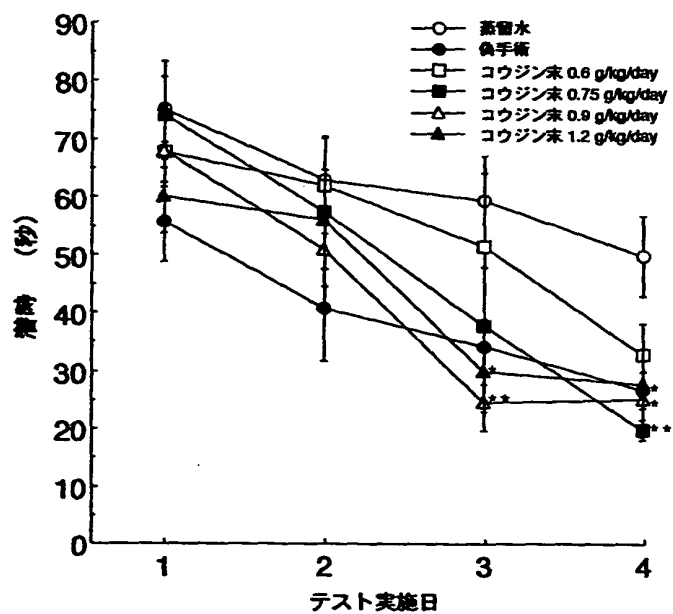
【図 13】

図 13 の (A) は偽手術動物、(B) は蒸留水投与 3 分虚血動物、(C) はコウジン末投与 3 分虚血動物の、海馬 CA1 領域光学顕微鏡像をそれぞれ示す。バーは 100 μ m を示す。

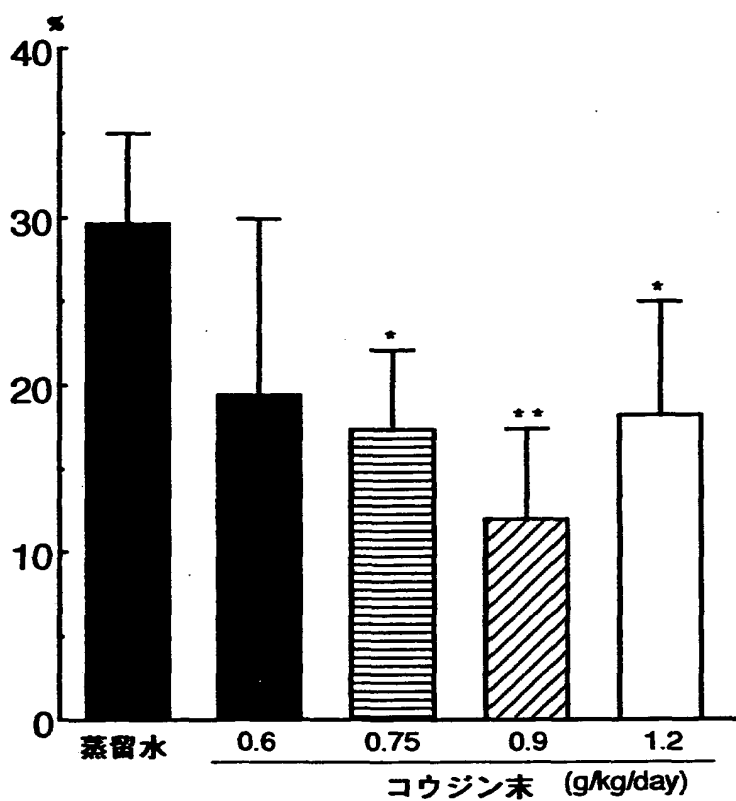
特平 1 1 - 2 4 3 3 7 8

【書類名】 図面

【図 1】

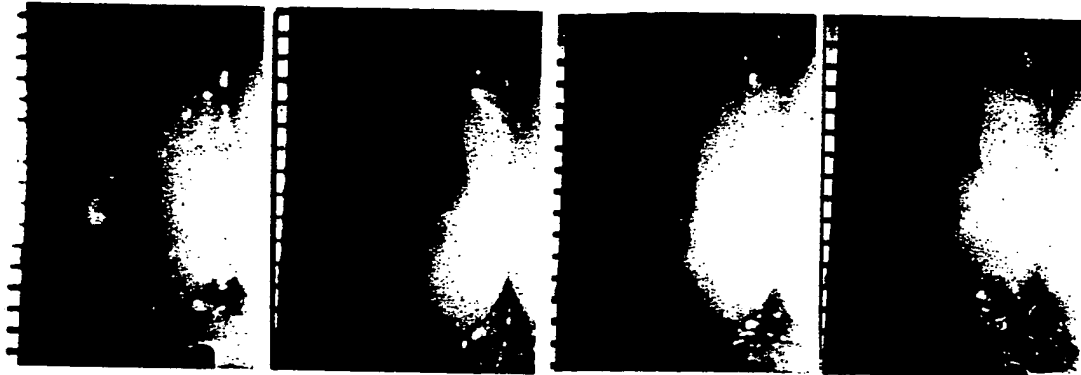


【図 2】

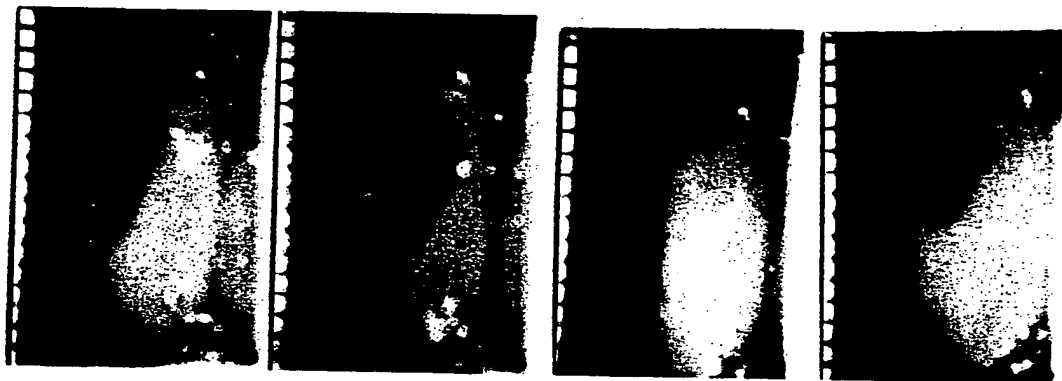


【図 3】

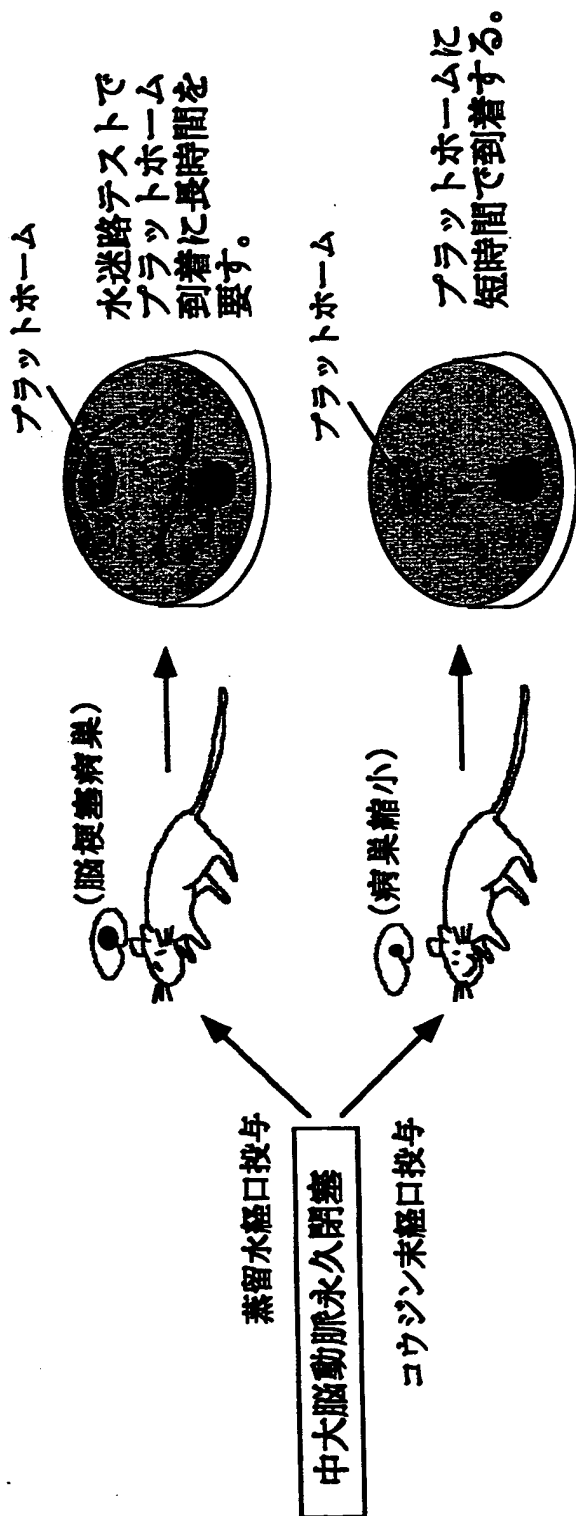
蒸留水投与虚血群



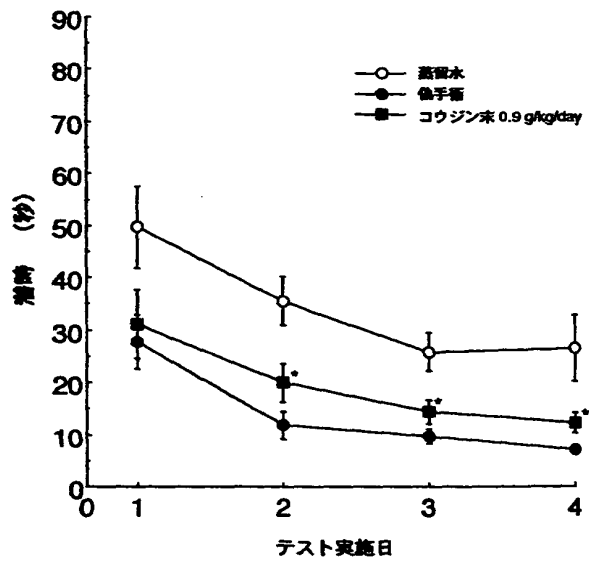
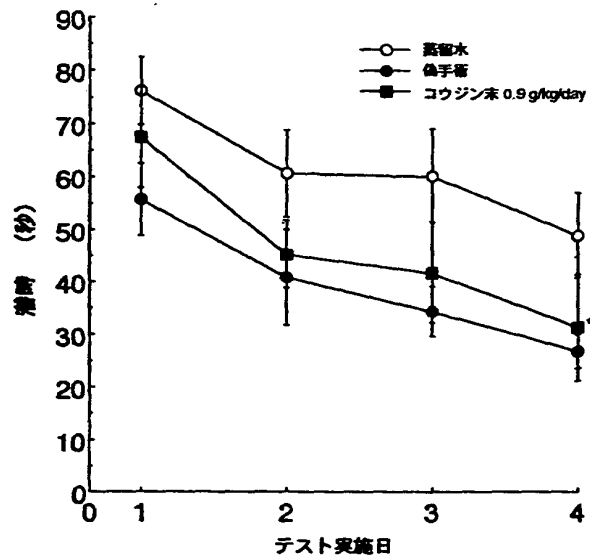
コウジン末投与虚血群



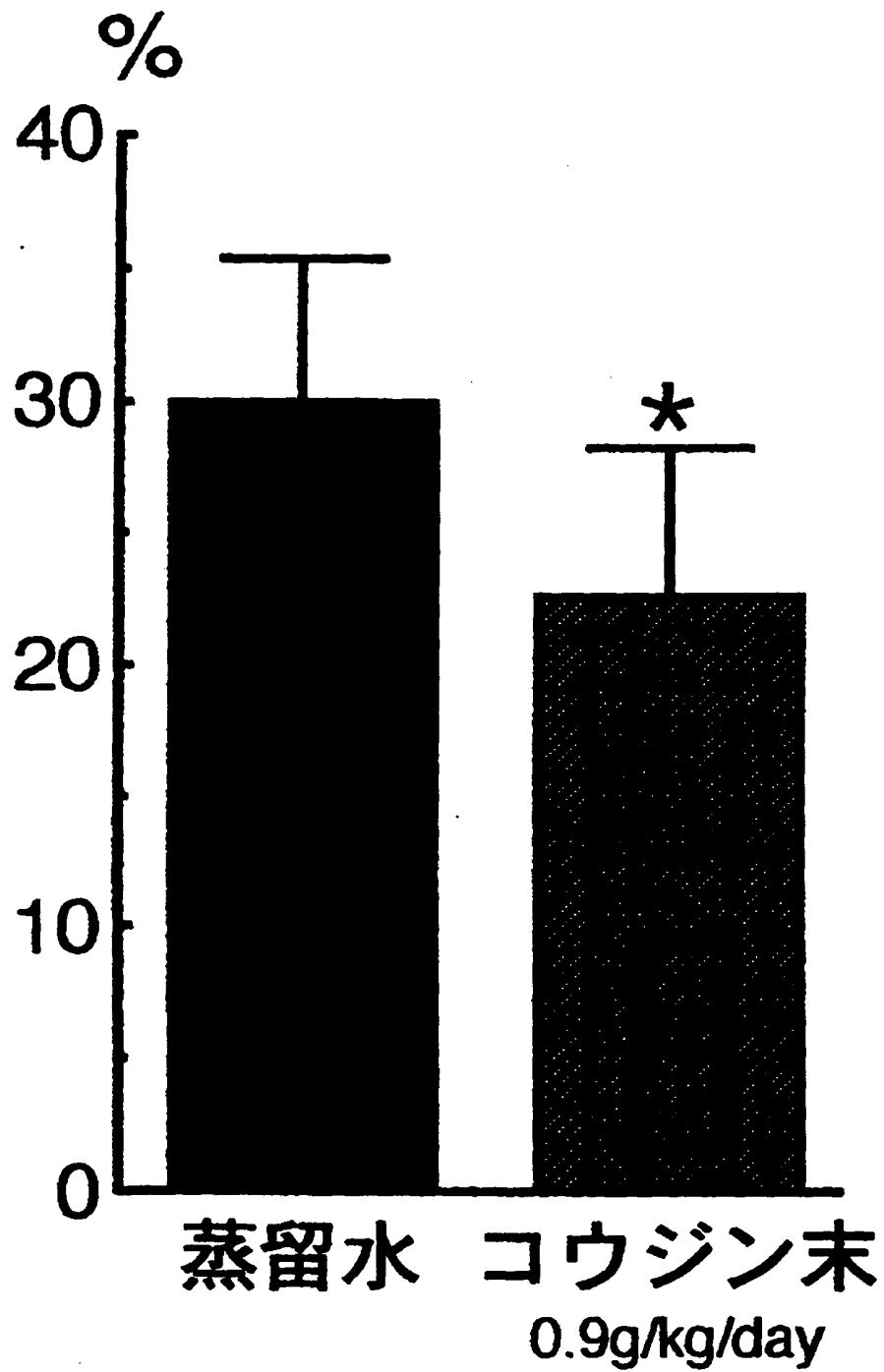
【図4】



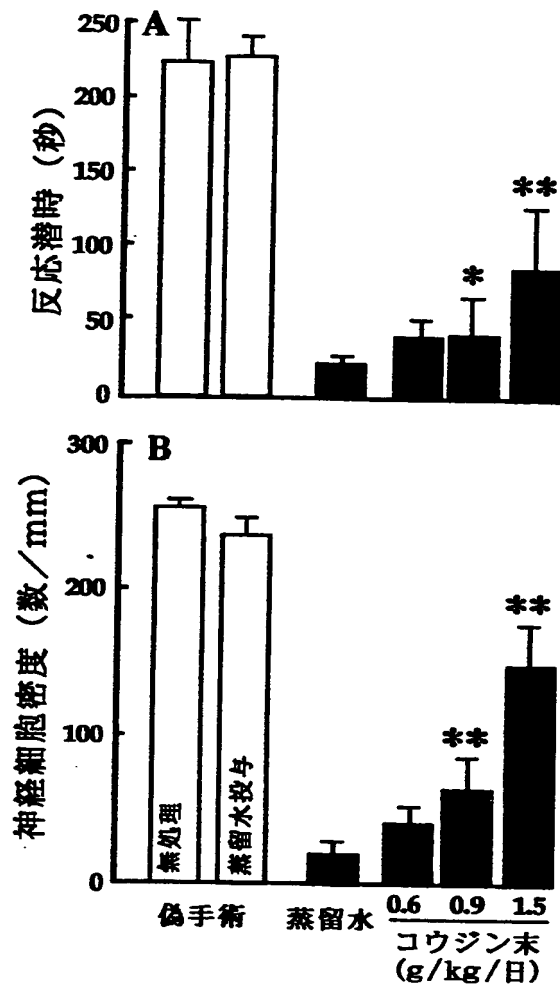
【図 5】



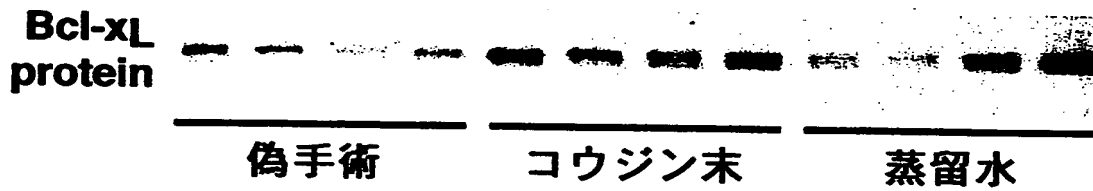
【図6】



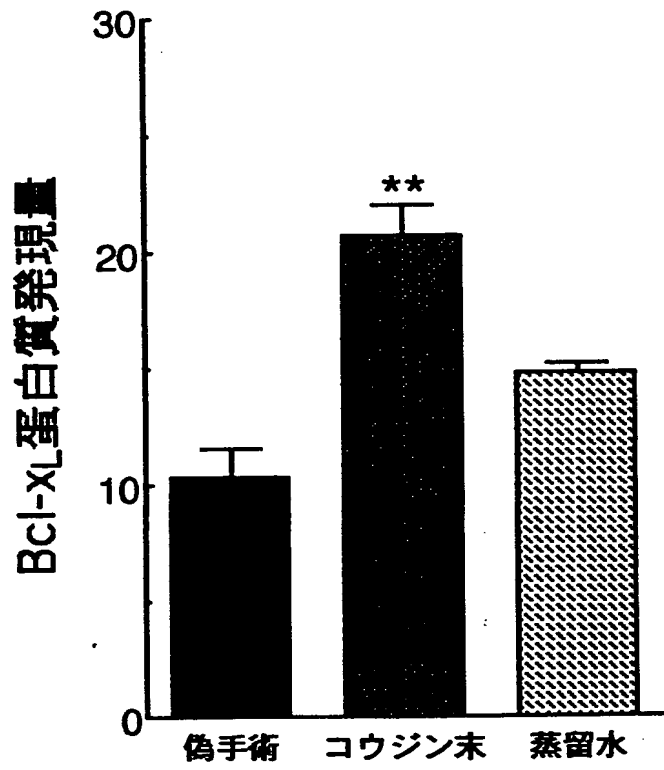
【図 7】



【図 8】



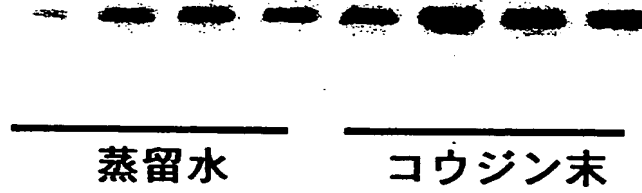
【図9】



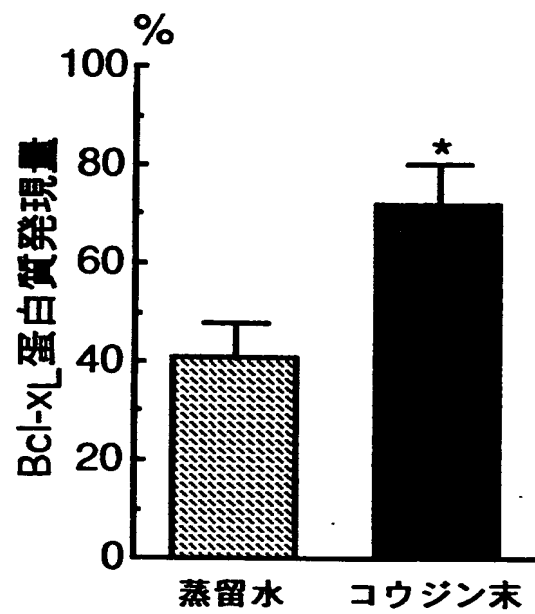
【図 1 0】

A

Bcl-x_L protein

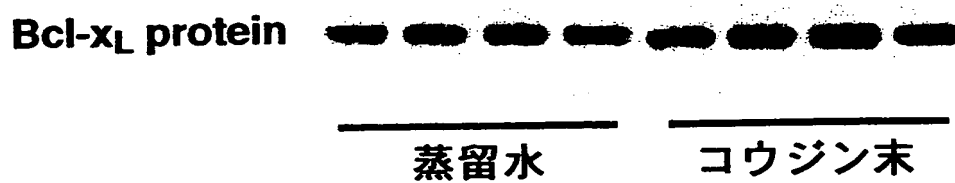


B

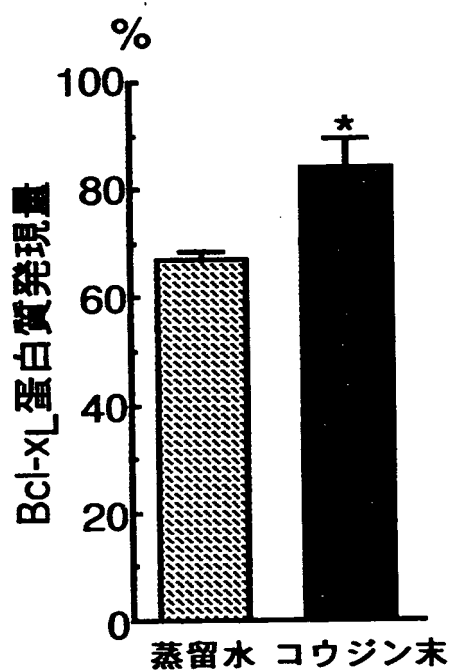


【図 1 1】

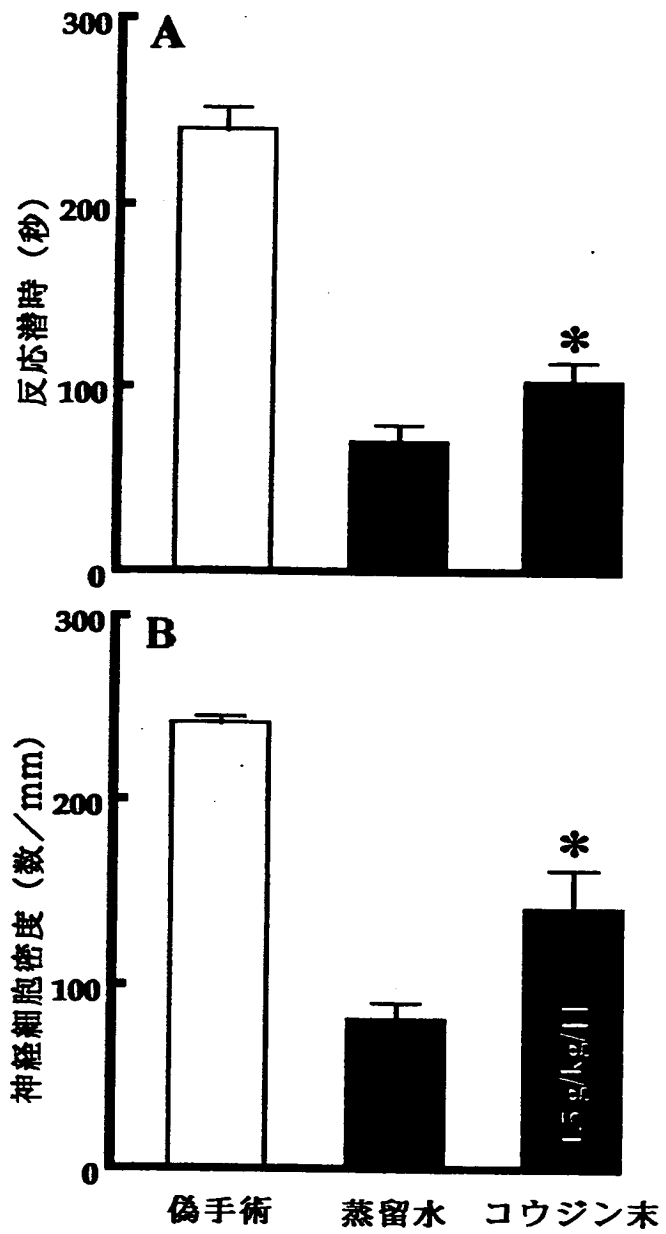
A



B



【図 12】



【図13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、細胞保護剤として有用なコウジン末の有効な投与用製剤を提供する。より詳細には、コウジン末からなるアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、又は、細胞死抑制遺伝子産物 B c l - x_L の発現を促進させるための医薬組成物を提供するものである。また、本発明は、コウジン末からなる経口投与用製剤を提供するものである。

【解決手段】 本発明は、コウジン末からなる医薬組成物に関し、本発明の医薬組成物は細胞死抑制遺伝子産物 B c l - x_L 蛋白の発現を促進させ、また、アポトーシスまたは、アポトーシス様細胞死を抑止する作用を有する。さらに、本発明は、コウジン末からなる経口投与用製剤に関し、特に脳・神経疾患の治療、予防又は処置のために有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団



47
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference JA903279	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04102	International filing date (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)	Priority date (day/month/year) 30 August 1999 (30.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 35/78, 31/704, A61P 9/08, 25/00, 43/00, C07J 17/00, G01N 33/15, 33/50		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 13 November 2000 (13.11.00)	Date of completion of this report 07 August 2001 (07.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04102

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-149, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 1,3-7,10-15,19-21,24,25,33,35,41,42,45,46,50,53-89, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 2,9,17,18,23,27-32,34,36-40,44,47-49,51,52, filed with the letter of 20 April 2001 (20.04.2001)
- ☒ the drawings:
pages 1-19,21-29, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages 20, filed with the letter of 20 April 2001 (20.04.2001)
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. 8,16,22,26,43
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04102

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 3.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-7,9-15,17-21,23-25,27-42,44-89



Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

The inventions set forth in Claims 1, 2, 18, 40 and 43 relate to 1) pharmaceutical compositions for promoting expression of cell death suppressor gene product Bcl-XL, 2) pharmaceutical compositions for suppressing apoptosis of cells or apoptosis-like cell death, 3) pharmaceutical compositions for treating, preventing or managing brain and nerve conditions, 4) pharmaceutical compositions for treating, preventing or managing heart conditions, and 5) preparations for intravenous administration, respectively, containing ginseng, or an extract thereof, or a component of ginseng or a metabolite thereof or a salt thereof. The inventions set forth in Claims 53, 56, 58 and 60 relate to 5) pharmaceutical compositions for preventing, treating, managing or reducing oedema, 6) pharmaceutical preparations for preventing, treating or managing bed sores, 7) pharmaceutical preparations for preventing, treating or managing neural paralysis and 8) pharmaceutical preparations for preventing, treating or managing disorders of urination or defaecation, respectively, which contain ginsenoside Rb1 or a metabolite thereof or a salt thereof. The invention set forth in Claim 74 relates to 9) dihydroginsenoside Rb1 represented by structural formula (II) or a metabolite thereof of a salt thereof. The invention set forth in Claim 81 relates to 10) a method for screening active ingredients for preventing, managing or treating disease of nervous tissue or spinal cord tissue with medical ginseng or an extract thereof or a component of medical ginseng or a metabolite thereof or salt thereof as a lead compound.

The invention set forth in Claim 86 relates to 11)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

the use of a ginseng saponin fraction constituent or metabolite thereof as a lead compound for screening of agents for treating nervous trauma, agents for treating spinal cord injury, agents for treating cranial trauma, agents for protecting brain cells or agents for protecting nerve cells.

1) to 11) above differ from one another in their applications, etc.; therefore, the group of inventions 1-11) is not a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, and this international application does not satisfy the condition of unity.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/04102

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7, 9-15, 17-21, 23-25, 27-42, 45, 46, 50, 53-89	YES
	Claims	44, 47-49, 51, 52	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-7, 9-15, 17-21, 23-25, 27-42, 45, 46, 50, 53-68	YES
	Claims	44, 47-49, 51, 52, 69, 72, 73, 81-89	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7, 9-15, 23-25, 27-42, 44-89	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

- Document 1: Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 32, No. 6, pp. 406-410, 1997
- Document 2: Korean J. Ginseng Sci., Vol. 17, No. 1, pp. 44-48, 1996
- Document 3: Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 17, No. 1, pp. 44-48, 1996
- Document 4: Neuroscience Research, Vol. 28, pp. 191-200, 1997
- Document 5: Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 30, No. 9, 1995
- Document 6: Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, Vol. 8, No.1, pp. 7-12, 1994
- Document 7: Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, Vol. 3, No. 1, pp. 18-21, 1989
- Document 8: Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 13, No. 5, pp. 403-406, 1992
- Document 9: Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 7, No. 3, pp. 222-226, 1986
- Document 10: Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol. 23, No. 8., pp. 728-732, 1996
- Document 11: Acta Pharmaceutica Sinica, Vol. 22, No. 1, pp. 1-5, 1987
- Document 12: Chem. Pharm. Bull., Vol. 40, No. 2, pp.

314-317, 1992

Document 13: Chem. Pharm. Bull., Vol. 21, No. 13, pp.

2702-2711, 1973

Document 14: JP, 316527, A (Testuo Mori) 15 November 1994
(15.11.94)

Document 15: WO, 90/08315, A (Pang P K T), 26 July 1990
(26.07.90) & JP, 4-504414, A & US, 4966893, A
& EP, 453515, A & US, 5137878, A & DE,
69032201, B & KR, 160104, B

Claims 1-7, 9-15, 17-21, 23-25, 27-42, 45, 46, 50,
53-68, 70, 71 and 74-80 are novel and involve an inventive
step, since they are not disclosed in Documents 1-15 and
are not obvious to a person skilled in the art from
disclosures in these documents.

Claims 44, 47 and 48 and Claims 49, 51 and 52 are
not novel, because they are disclosed in Documents 3 and 7
and Document 9, respectively.

A person skilled in the art could easily deduce
Claims 69, 72 and 73 from disclosure of the application of
ginsenoside Rb1 as a myocardial cell protecting agent in
Document 8 and the disclosure of ginsenoside Rb1 as a
preparation for intravenous administration in Documents 3
and 7. Similarly, from the disclosures in Documents 1-11
and 15 a person skilled in the art would have no
difficulty, having specified an active ingredient of
medical ginseng, in using this ingredient as a lead
compound to obtain active ingredients with similar
pharmacological effects, giving Claims 81-89.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
JP 00/04102

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: V.

V-1 Opinion

Inventive step (IS) Claims 70, 71, 74-80 YES

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 27 AUG 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 JA903279	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04102	国際出願日 (日.月.年) 22.06.00	優先日 (日.月.年) 30.08.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ A61K35/78, 31/704, A61P9/08, 25/00, 43/00, C07J17/00, G01N33/15, 33/50		
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。

☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。

(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)

この附属書類は、全部で 6 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

IV ☒ 発明の単一性の欠如

V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日
13.11.00

国際予備審査報告を作成した日
07.08.01

名称及びあて先
日本国特許庁(IPEA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

4C 8415

鶴見 秀紀



電話番号 03-3581-1101 内線 3452

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-149 ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 1,3-7,10-15,19-21,24, 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 2,9,17,18,23,27-32,34, 項、 20.04.01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-19, 21-29 ~~ページ~~/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ~~ページ~~/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 20 ~~ページ~~/図、 20.04.01 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 8,16,22,26,43 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. ☒ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

請求の範囲1、2、18、40、43は、薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなるそれぞれ1)細胞死抑制遺伝子産物Bcl-xLの発現を促進させるための医薬組成物、2)細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、3)脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物、4)心臓疾患の治療、予防または処置のための医薬組成物又は5)静脈内投与製剤に係わる発明である。また、請求の範囲53、56、58、60は、ジンセノサイドRb1もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるそれぞれ5)生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物、6)褥創の予防・治療・処置用医薬組成物、7)神経麻痺の予防・治療・処置用医薬組成物、8)排尿障害もしくは排便障害の予防・治療・処置用医薬組成物に係わる発明である。また、請求項74は、9)構造式(II)で示されるジヒドロジンセノサイドRb1もしくはその代謝産物又はそれらの塩に係わる発明である。また、請求項81は、10)薬用人参もしくはそのエキスまたは薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩をリード化合物として、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索する方法に係わる発明である。

また、請求項86は、11)神経外傷治療剤、脊髄損傷治療剤、頭部外傷治療剤、脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としての薬用人参サポニン分画構成成分のいずれか又はその代謝産物の使用に係わる発明である。

そして、これらの上記1)～11)は、使用用途等において、それぞれ異なるものであるので、1)～11)に記載された発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められず、この国際出願は単一性を満たしているものとは認められない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☐ すべての部分
- ☒ 請求の範囲 1-7, 9-15, 17-21, 23-25, 27-42, 44-89 に関する部分

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 I、V 欄の続き

I - 1

請求の範囲 25, 33, 35, 41, 42, 45, 46, 50, 53-89 項

出願時に提出されたもの

請求の範囲 36-40, 44, 47-49, 51, 52 項

20.04.01 付けの書簡と
共に提出されたもの

V - 1 見解

進歩性 (I S)

請求の範囲 70, 71, 74-80 有

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲	1-7, 9-15, 17-21, 23-25, 27-42, 45, 46, 50, 53-89	有
請求の範囲	44, 47-49, 51, 52	無

進歩性(IS)

請求の範囲	1-7, 9-15, 17-21, 23-25, 27-42, 45, 46, 50, 53-68	有
請求の範囲	44, 47-49, 51, 52, 69, 72, 73, 81-89	無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲	1-7, 9-15, 23-25, 27-42, 44-89	有
請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1. Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 32, no. 6, p406-410, 1997
 文献2. Korean J. Ginseng Sci., vol. 22, no. 1, p66-72, 1998
 文献3. Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 17, no. 1, p44-48, 1996
 文献4. Neuroscience Research vol. 28, p191-200, 1997
 文献5. Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 30, no. 9, 1995
 文献6. Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 8, no. 1, p7-12, 1994
 文献7. Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 3, no. 1, p18-21, 1989
 文献8. Acta Pharmacologica Sinica, vol. 13, no. 5, p403-406, 1992
 文献9. Acta Pharmacologica Sinica, vol. 7, no. 3, p222-226, 1986
 文献10. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, vol. 23, no. 8. p728-732, 1996
 文献11. Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 22, no. 1, p1-5, 1987
 文献12. Chem. Pharm. Bull., vol. 40, no. 2, p314-317, 1992
 文献13. Chem. Pharm. Bull., vol. 21, no. 13, p2702-2711, 1973
 文献14. JP, 6-316527, A(毛利哲朗) 15. 11月. 1994(15. 11. 94)
 文献15. WO, 90/08315, A(PANG P K T) 26. 7月. 1990(26. 07. 90)&JP, 4-504414, A&US, 4966893, A&EP, 453515, A&US, 5137878, A&DE, 69032201, B&KR, 160104, B

請求項1-7, 9-15, 17-21, 23-25, 27-42, 45, 46, 50, 53-68, 70, 71, 74-80は上記文献1～15に記載されておらず、かつその記載された事項から当業者にとっても自明とも認められないので、新規性及び進歩性を有する。

請求項44, 47, 48は文献3, 7に、請求項49, 51, 52は文献9に記載されているので新規性を有しない。

請求項69, 72, 73は、文献8のジンセノサイドRb1を心筋細胞保護剤に適用すること及び文献3, 7のジンセノサイドRb1を静脈内投与製剤とする記載に基づいて当業者によれば容易に為し得ることである。請求項81-89は、文献1-11, 15の記載に基づいて、薬用人参の有効成分が特定されればその成分をリード化合物にし、そして同じ薬効の有効成分得ることは、当業者によればさほどの困難性を有せずなし得ることである。

請 求 の 範 囲

1. 薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x_L の発現を促進させるための医薬組成物。
2. (補正後) 患部組織における細胞外液濃度が 14.5 ng/ml 以下になるように調整されている薬用人蔘もしくはそのエキス又は薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、脳細胞、神経細胞、神経幹細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞、線維芽細胞、胆管上皮細胞、脂肪蓄積細胞、リンパ球、白血球、細網細胞、大食細胞もしくは形質細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物。
3. 薬用人蔘のエキスが薬用人蔘の抽出物である請求の範囲第1項又は第2項に記載の医薬組成物。
4. 薬用人蔘もしくはそのエキスが、コウジン末又はその抽出物である請求の範囲第1項又は第2項に記載の医薬組成物。
5. 薬用人蔘成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩が、薬用人蔘の粗サポニン分画、非サポニン分画、精製サポニン類、又はサポニン分画構成成分もしくはその塩である請求の範囲第1項又は第2項に記載の医薬組成物。
6. 細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x_L の発現を促進させる組織が脳神経組織もしくは脊髄組織である請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の医薬組成物。
7. 細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-x_L の発現を促進させる組織が肝臓又は脾臓である請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の医薬組成物。
8. (削除)
9. (補正後) 請求の範囲第2項に記載の細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様細胞死をきたす疾患の治療、予防、又は処置のための請求の範囲第2項～第5項のいずれかに記載の医薬組成物。
10. 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の医薬組成物。



1 1. 脳・神経疾患が脳血管性痴呆、脳梗塞又は脳卒中である請求の範囲第 1 0 項に記載の医薬組成物。

1 2. 経口投与用製剤である請求の範囲第 1 項～第 1 1 項のいずれかに記載の医薬組成物。

1 3. 哺乳動物に対する投与量が 1 日あたり $1/6 \sim 1/2$ g/kg である請求の範囲第 1 2 項に記載の医薬組成物。

1 4. 静脈内投与用製剤である請求の範囲第 1 項～第 1 1 項のいずれかに記載の医薬組成物。

1 5. 単回静脈内注入用製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第 1 4 項に記載の医薬組成物。

1 6. (削除)

1 7. (補正後) 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が $1 \sim 1450$ fg/ml もしくは $1 \sim 145000$ fg/ml である請求の範囲第 1 2 項～第 1 5 項のいずれかに記載の静脈内投与用製剤。

1 8. (補正後) 患部における細胞外液濃度が 14.5 ng/ml 以下となるように調整されている薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髓組織の損傷による疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物。

1 9. 薬用人参のエキスが薬用人参の抽出物である請求の範囲第 1 8 項に記載の医薬組成物。

2 0. 薬用人参もしくはそのエキスが、コウジン末又はその抽出物である請求の範囲第 1 8 項に記載の医薬組成物。

2 1. 薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩が、薬用人参の粗サポニン分画、非サポニン分画、精製サポニン類、又はサポニン分画構成成分もしくはその塩である請求の範囲第 1 8 項に記載の医薬組成物。

2 2. (削除)

2 3. (補正後) 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の濃度が $1 \sim 1450$ fg/ml もしくは $1 \sim 145$



0 0 0 f g / m l である請求の範囲第 1 8 項～第 2 1 項のいずれかに記載の医薬組成物。

2 4 . 静脈内投与用製剤である請求の範囲第 1 8 項～第 2 3 項のいずれかに記載の医薬組成物。

2 5 . 単回静脈内注入用製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第 2 4 項に記載の医薬組成物。

2 6 . (削除)

2 7 . (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、脊髄損傷である請求の範囲第 1 8 項～第 2 5 項のいずれかに記載の医薬組成物。

2 8 . (補正後) 上肢もしくは下肢の麻痺を改善させることによるものである請求の範囲第 2 7 項に記載の医薬組成物。

2 9 . (補正後) 排尿障害もしくは排便障害を改善させることによるものである請求の範囲第 2 7 項に記載の医薬組成物。

3 0 . (補正後) 神経因性膀胱を改善させることによるものである請求の範囲第 2 7 項に記載の医薬組成物。

3 1 . (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が神経組織の二次変性である請求の範囲第 1 8 項～第 2 5 項のいずれかに記載の医薬組成物。

3 2 . (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が神経組織又は脊髄組織の外傷である請求の範囲第 1 8 項～第 2 5 項のいずれかに記載の医薬組成物。

3 3 . 外傷が、脊髄損傷、神経外傷もしくは頭部外傷である請求の範囲第 3 2 項に記載の医薬組成物。

3 4 . (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患がオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死による疾患である請求の範囲第 1 8 項～第 2 5 項のいずれかに記載の医薬組成物。

3 5 . オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死をきたす疾患が脊髄損傷である請求の範囲第 3 4 項に記載の医薬組成物。

3 6 . (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が脱髄である請求の範囲第 1 8 項～第 2 5 項のいずれかに記載の医薬組成物。

3 7 . (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が脳浮腫、脳神経組織

の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

38. (補正後) 脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫をきたす疾患が、脳出血、クモ膜下出血、頭部外傷、脊髄損傷、又は神経外傷である請求の範囲第37項に記載の医薬組成物。

39. (補正後) 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、脊髄損傷、頭部外傷又は神経外傷である請求の範囲第18項～第25項のいずれかに記載の医薬組成物。

40. (補正後) 患部組織における細胞外液濃度が 14.5 ng/ml 以下となるように調整されている薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなる心臓疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物。

41. 心臓疾患が心筋細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様心筋細胞死を伴うものである請求の範囲第40項に記載の医薬組成物。

42. 薬用人参のサポニン分画構成成分のいずれかがジンセノサイド R_b である請求の範囲第5項又は第21項に記載の医薬組成物。

43. (削除)

44. (補正後) 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなる静脈内投与用製剤。

45. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が 1 ng/ml 以下となるように調整されている請求の範囲第44項に記載の静脈内投与用製剤。

46. 薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩の患部組織における細胞外液濃度が $1 \sim 100 \text{ fg/ml}$ もしくは $1 \sim 10000 \text{ fg/ml}$ である請求の範囲第45項に記載の静脈内投与用製剤。

47. (補正後) 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための請求の範囲第44項～第46項いずれかに記載の静脈内投与用製剤。

48. (補正後) 脳・神経疾患が脊髄損傷、頭部外傷、神経外傷、脳血管性痴呆、

脳梗塞、脳卒中又は一過性脳虚血発作である請求の範囲第47項に記載の静脈内投与用製剤。

49. (補正後) 心臓疾患の治療、予防又は処置のための請求の範囲第44項～第46項いずれかに記載の静脈内投与用製剤。

50. 心臓疾患が、心筋細胞のアポトーシスもしくはアポトーシス様心筋細胞死を伴うものである請求の範囲第49項に記載の静脈内投与用製剤。

51. (補正後) 単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与製剤である請求の範囲第44項～第50項いずれかに記載の静脈内投与用製剤。

52. (補正後) 請求の範囲第44項～第51項のいずれかに記載の静脈内投与用製剤からなる脳細胞、神経細胞又は心筋細胞の保護剤。

53. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物。

54. 生体組織の浮腫が脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫である請求の範囲第53項に記載の医薬組成物。

55. 脳浮腫、脳神経組織の浮腫もしくは脊髄組織の浮腫をきたす疾患が、脳卒中、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、頭部外傷、脊髄損傷、又は神経外傷である請求の範囲第54項に記載の医薬組成物。

56. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる褥創の予防、処置又は治療用医薬組成物。

57. 褥創が脊髄損傷によるものである請求の範囲第56項に記載の医薬組成物。

58. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経麻痺の予防・治療・処置用医薬組成物。

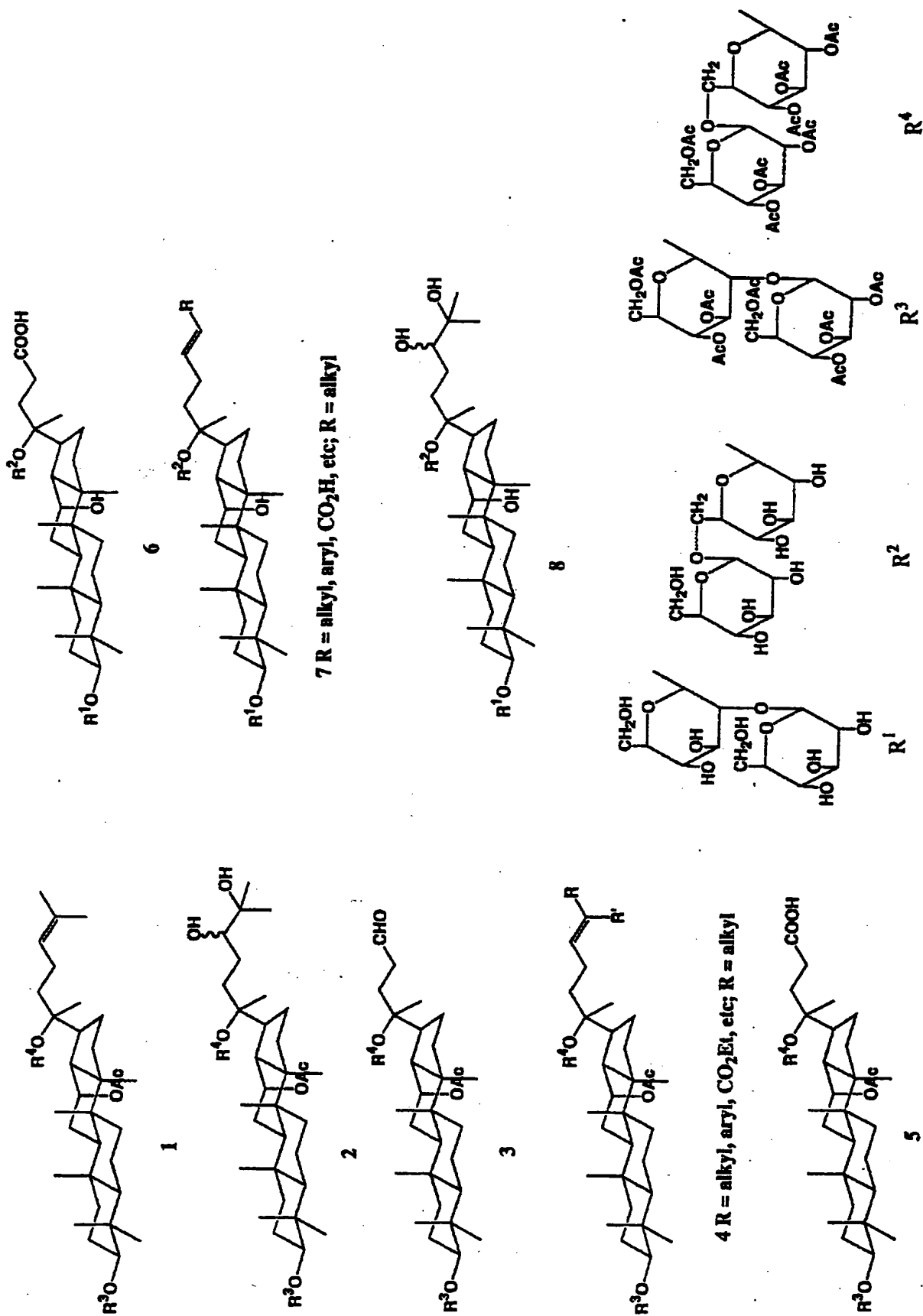
59. 神経麻痺が脊髄損傷後の上肢または下肢の対麻痺である請求の範囲第58項に記載の医薬組成物。

60. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる排尿障害もしくは排便障害の予防・治療・処置用医薬組成物。

61. 排尿障害もしくは排便障害が脊髄損傷によるものである請求の範囲第60



第 20 図





国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 JA903279	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04102	国際出願日 (日.月.年) 22.06.00	優先日 (日.月.年) 30.08.99
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1、2、18、40、43 は、薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなるそれぞれ 1) 細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL の発現を促進させるための医薬組成物、2) 細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、3) 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物、4) 心臓疾患の治療、予防または処置のための医薬組成物又は 5) 静脈内投与製剤に係わる発明である。また、請求の範囲 53、56、58、60 は、ジンセノサイド Rb1 もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるそれぞれ 5) 生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物、6) 褥創の予防・治療・処置用医薬組成物、(続き有り)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



第Ⅱ欄の続き

7) 神経麻痺の予防・治療・処置用医薬組成物、8) 排尿障害もしくは排便障害の予防・治療・処置用医薬組成物に係わる発明である。

また、請求項74は、9) 構造式(Ⅱ)で示されるジヒドロジンセノサイドRb1もしくはその代謝産物又はそれらの塩に係わる発明である。

また、請求項81は、10) 薬用人参もしくはそのエキスまたは薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩をリード化合物として、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索する方法に係わる発明である。

また、請求項86は、11) 神経外傷治療剤、脊髄損傷治療剤、頭部外傷治療剤、脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としての薬用人参サポニン分画構成成分のいずれか又はその代謝産物の使用に係わる発明である。

そして、これらの上記1)～11)は、使用用途等において、それぞれ異なるものであるので、1)～11)に記載された発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められず、この国際出願は単一性を満たしているものとは認められない。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 32, no. 6, p406-410, 1997 "Study on the anti-apoptotic mechanism of ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons" JQ Li et al	2-5, 9, 18-21 81, 83-89
X	Korean J. Ginseng Sci., vol. 22, no. 1, p66-72, 1998 "Radioprotective Effect of Red Ginseng in Irradiated Mice with High and Low Dose of Radiation" Sung-Ho Kim et al	2-5, 9
X	Acta Pharm. Sinica, vol. 17, no. 1, p44-48, 1996 "Influences of ginsenosides Rb1 and Rg1 on reversible focal brain ischemia in rats" ZHANG Ying-Ge et al	18-21, 24, 25, 43, 47
Y		22, 23, 27, 44-

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.09.00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀

4 C

8 4 1 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Neuroscience Research vol. 28, p191-200, 1997	46, 81-89
Y		18-21
X	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 30, no. 9, 1995	81-89
Y		18-21
X	Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 8, no. 1, p7-12, 1994 "Protective Effects of Total Saponins of Panax Ginseng on ischemia-reperfusion injury in rat brains" ZHANG Ying-Ge et al	81-89
		18-21, 37-39
X	Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 3, no. 1, p18-21, 1989 "Protective effect of ginsenoside on acute cerebral ischemia/reperfusion injury of rats" CHU, Guoxiang et al	37-39, 43, 47, 48
X	Acta Pharmacologica Sinica, vol. 13, no. 5, p403-406, 1992 "Influences of ginsenosides Rb1, Rb2, and Rb3, on electric and contractile activities of normal and damaged cultured myocardiocytes" JIANG Yan et al	40, 42
Y		41
X	Acta Pharmacologica Sinica, vol. 7, no. 3, p222-226, 1986 "Beneficial changes in prostacyclin and thromboxane A ₂ by ginsenosides in myocardial infarction and reperfusion injury of dogs" FANG Yun-xiang et al	40, 44, 49, 52
Y		41, 42
X	Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, vol. 23, no. 8, p728-732, 1996 "CARDIOVASCULAR PROTECTION BY GINSENOSES AND THEIR NITRIC OXIDE RELEASING ACTION" Xiu Chen	40, 42
Y		41
X	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 22, no. 1, p1-5, 1987 "THE PROTECTIVE EFFECT OF GINSENOSES AND ITS COMPONENTS ON MYOCYTES ANOXIA/REOXYGENATION AND MYOCARDIAL REPERFUSION INJURY" LI Yuan-Jian	40, 42
Y		41
A	Chem. Pharm. Bull., vol. 40, no. 2, p314-317, 1992 "Studies on the Enzyme Immunoassay of Bio-active Constituents in Oriental Medicinal Drugs. VI. Enzyme Immunoassay of Ginsenoside Rb1 from Panax ginseng" Matao Kanaoka et al	74-80
Y	Chem. Pharm. Bull., vol. 21, no. 13, p2702-2711, 1973 "Studies on the Constituents of Himalayan Ginseg, Panax pseudoginseng. I. The Structure of the Saponins" Noriko Kondo et al	74-80
P, X	JP, 2000-159793, A (大正製薬株式会社) 13. 6月. 2000 (13. 06. 00) ファミリーなし	2, 3, 5, 9, 40
X	JP, 6-316527, A (毛利哲朗) 15. 11月. 1994 (15. 11. 94) ファミリーなし	41
		18, 19
X	WO, 90/08315, A (PANG P K T) 26. 7月. 1990 (26. 07. 90) & JP, 4-504414, A&US, 4966893, A&EP, 453515, A&US, 5137878, A&DE, 69032201, B&KR, 160104, B	18-21
Y		81-89

PCT

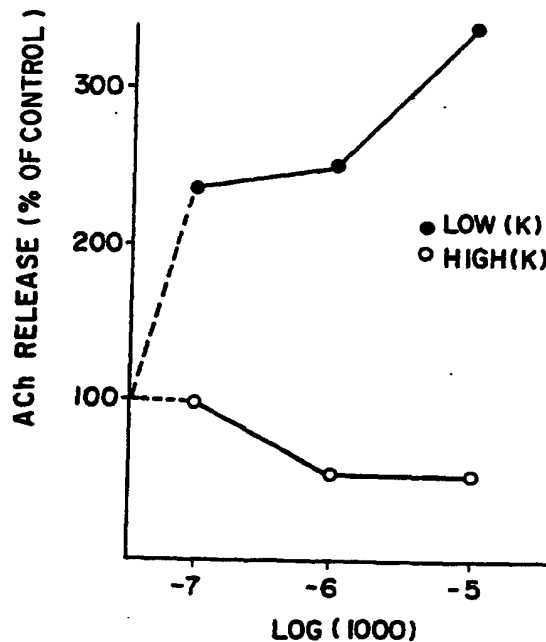
WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁵ : G01N 31/00, A01N 31/00 A61K 31/715		A1	(11) International Publication Number: WO 90/08315 (43) International Publication Date: 26 July 1990 (26.07.90)
(21) International Application Number: PCT/US90/00121 (22) International Filing Date: 12 January 1990 (12.01.90) (30) Priority data: 297,012 13 January 1989 (13.01.89) US (60) Parent Application or Grant (63) Related by Continuation US 297,012 (CIP) Filed on 13 January 1989 (13.01.89) (71)(72) Applicants and Inventors: PANG, Peter, K., T. [US/CA]; 52225 Range Road, 205 Carriage Lane, Sherwood Park, Alberta T8A 2A6 (CA). WANG, Lawrence, C., H. [CA/CA]; 5012-144 St., Edmonton, Alberta T6G 2E9 (CA). BENISHIN, Christina, G. [CA/CA]; 218-53431 Range Rd., 221, Ardressan, Alberta T0B 0E0 (CA). LIU, Hsing, J. [CA/CA]; 3543-105B St., Edmonton, Alberta T6J 2K9 (CA).		(74) Agent: MURRAY, Robert, B.; Armstrong, Nikaido, Marmelstein, Kubovcik & Murray, Suite 1000, 1725 K Street, N.W., Washington, DC 20006 (US). (81) Designated States: AT, AT (European patent), AU, BB, BE (European patent), BF (OAPI patent), BG, BJ (OAPI patent), BR, CA, CF (OAPI patent), CG (OAPI patent), CH, CH (European patent), CM (OAPI patent), DE, DE (European patent), DK, DK (European patent), ES, ES (European patent), FI, FR (European patent), GA (OAPI patent), GB, GB (European patent), HU, IT (European patent), JP, KP, KR, LK, LU, LU (European patent), MC, MG, ML (OAPI patent), MR (OAPI patent), MW, NL, NL (European patent), NO, RO, SD, SE, SE (European patent), SN (OAPI patent), SU, TD (OAPI patent), TG (OAPI patent), US. Published With international search report.	

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR TREATMENT OF SENILE DEMENTIA



(57) Abstract

Ginsenosides Rb₁ and Rg₁ enhance the availability of acetylcholine in the cortical and hippocampal regions of the brain and alleviate the symptoms of Alzheimer-type senile dementia. The Rb₁ or Rg₁ may be administered together with a metabolic precursor for acetylcholine and/or with a cholinesterase inhibitor. Pure Rb₁ is located from a mixture of ginsenosides by a process involving vacuum chromatography on silica gel. Preferably, the mixture of ginsenosides is enriched in Rb₁ by partition between an aqueous system and water ethyl acetate-butanol.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	ES	Spain	MG	Madagascar
AU	Australia	FI	Finland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	France	MR	Mauritania
BE	Belgium	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BG	Bulgaria	HU	Hungary	NO	Norway
BJ	Benin	IT	Italy	RO	Romania
BR	Brazil	JP	Japan	SD	Sudan
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SE	Sweden
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SN	Senegal
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Switzerland	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Germany, Federal Republic of	MC	Monaco	US	United States of America
DK	Denmark				

-1-

COMPOSITION AND METHOD FOR TREATMENT OF SENILE DEMENTIA

This application is a continuation-in-part of application Serial No. 07/297,012, filed January 13, 1989.

5 The present invention is directed to compositions and methods for alleviating the symptoms of senile dementia of the Alzheimer's type. In one specific aspect, the present invention is directed to an improved process for the isolation and purification of a ginsenoside useful in practicing that method.

Background of the Invention

10 Senile dementia of the Alzheimer's type (SDAT) is widely recognized as a problem of increasing proportions in North America as well as around the world. The disease is associated with progressive physical and mental impairment to the point where the patient requires total care, and becomes a tremendous social and economic burden. Progress of the disease is believed to be related to degeneration of certain nerve tracts in the central nervous system, resulting in the loss of associated functions. Pathological studies indicate that brains of SDAT patients have loss of several neurotransmitter systems, related to different functions, but the system which is implicated the most is the cholinergic system. Studies show that several important cholinergic tracts innervating the cortical and hippocampal regions degenerate. Although this particular degeneration may not account for all of the symptoms of SDAT, it may account for the cognitive and memory deficits, which are some of the most difficult symptoms for patients and their families to deal with.

15

20

25

-2-

The pharmacological approaches which have been proposed for the managements of SDAT symptoms may be classified in two ways. The first is drugs which improve the function of existing neurons, especially to increase cholinergic nerve function. The
5 second is drugs which decrease degeneration/increase regeneration of nerves.

Two types of drugs have been used in clinical trials to improve central cholinergic functions. The first is compounds which increase the availability of the existing endogenous
10 neurotransmitter, acetylcholine (ACh); and the second is compounds which are exogenous, and mimic the effects of the endogenous transmitter at the receptor. However, these compounds exhibit side effects which limit their use.

It is generally believed that compounds which will
15 increase the availability of the endogenous neurotransmitter are more desirable. Substances in this category are cholinesterase inhibitors, such as physostigmine and pyridostigmine, which decrease the breakdown of ACh, thus prolonging its functional lifetime at the crucial location, the synaptic cleft, and choline
20 and lecithin, which increase the availability of the precursor for synthesis. Thus far, other compounds have not been described which directly increase the availability of the endogenous neurotransmitter ACh by any other mechanisms, except by blockade of inhibitory presynaptic receptors (with e.g. atropine or
25 clonidine), or by non-specific depolarization of nerves (e.g. veratridine).

Ginseng is the name given to the dried roots of the ginseng plants (genus Panax) and, more particularly, to extracts

-3-

of those roots. The roots and their extracts contain a variety of substances including saponins and sapogenins.

Ginseng has been extensively used, mostly in Asia, as a tonic to promote health and well being, and as a medicine in the treatment of various disease conditions. The beneficial attributes of ginseng are attributed to its saponin content, a mixture of glucosides referred to collectively as ginsenosides.

Discussion of the Prior Art

U.S. Patent 4,157,894 to Bombardelli discloses the isolation of saponins from ginseng roots and the use of a purified concentrate in the geriatric field for elderly patients having difficulty in digesting less concentrated preparations. Bombardelli also discloses the structures of saponins Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf and Rg.

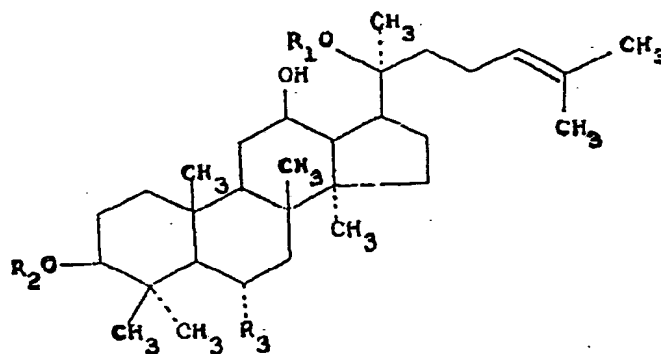
U.S. Patent 4,702,949 to Liu discloses a composition comprising 5-15% ginsenoside, 30-50% tetramethylpyrazine, 30-50% astragalin, and 5-15% atractylol in the treatment of cerebral vascular insufficiency and resultant paraplegia, hemiplegia and impaired neurofunction.

U.S. Patents 4,157,894; 4,317,816; 4,446,130; 4,647,460; 4,684,628; 4,687,761; and 4,755,504 disclose the use of ginseng or ginseng extracts, alone, or in combination with other substances for various medically related purposes.

A procedure for the isolation of a crude mixture of ginsenosides for ginseng is described by J. Shoji, "Advances in Chinese Medicinal Materials Research", World Scientific Publishing Company, Singapore, pages 455-469 (1985). Material prepared by this established procedure is commercially available.

The preparation of ginseng extracts is also disclosed by Bombardelli and by Liu, discussed above, and in the other U.S. patents listed above.

Rb₁ and Rg₁ have the structural formula:



5 In Rb₁, R₁ is D-glucose B(1→6)D-glucose, R₂ is D-glucose B(1→2)D-glucose and R₃ is H. In Rg₁, R₁ is D-glucose, R₂ is H, and R₃ is O-D-glucose.

Existing procedures for the isolation and purification of ginsenoside Rb₁ include standard column chromatography, thin-layer
10 chromatography, and high performance chromatography. These methods are laborious for the isolation of the compound in large quantities and often yield a low purity product.

Brief Description of the Invention

A primary object of the present invention is to provide
15 compositions and methods for the treatment of senile dementia of the Alzheimer's type.

Another object of the invention is to provide an improved process for the isolation and purification of a ginsenoside used in that method for treating senile dementia.

20 We have discovered that ginsenosides Rb₁ and Rg₁ directly and selectively increase acetylcholine function in the brain and,

-5-

accordingly, are useful in alleviating the symptoms of senile dementia. Those ginsenosides may be administered together with metabolic precursors for ACh synthesis and/or with cholinesterase inhibitors.

5 In one specific aspect, the present invention is a method for alleviating the symptoms of Alzheimer-type senile dementia, which comprises administering to a mammal affected with Alzheimer-type senile dementia an amount of ginsenoside Rb₁ or of ginsenoside Rg₁ effective to increase the availability of
10 acetylcholine in the cortical and hippocampal regions in the brain of the mammal.

 In a second specific aspect, the present invention is a process for the isolation of ginsenoside Rb₁ which comprises the steps:

- 15 (a) dissolving a mixture of ginsenosides in methyl alcohol;
- (b) adsorbing the mixture of ginsenosides on silica gel by containing the solution of the mixture in methyl alcohol with the silica gel and evaporating the
20 alcohol;
- (c) placing the silica gel having the mixture of ginsenosides adsorbed thereon in a column for vacuum chromatography prepacked with silica gel;
- (d) passing a mixture of chloroform and methyl alcohol
25 through the columns to elute ginsenoside Rb₁; and
- (e) recovering ginsenoside Rb₁ from the chloroform and methyl alcohol eluate.

-6-

A mixture of ginsenosides enriched in Rb₁ particularly useful as the starting material in the process of the present invention may be obtained by:

- 5 (a) dissolving a mixture of crude ginsenosides obtained by extraction of ginseng in water;
- (b) washing the aqueous solution of mixed ginsenosides with ethyl acetate;
- (c) extracting the ethyl acetate-washed solution successively with a mixture of 4 volumes of ethyl acetate and 1 volume of 1-butanol, with 1 volume of ethyl acetate and 1 volume of 1-butanol, and with 1-butanol pre-saturated with water;
- 10 (d) combining the ethyl acetate-1-butanol and 1-butanol-water extracts; and
- 15 (e) recovering a mixture of ginsenosides enriched in Rb₁ from the combined extracts.

The vacuum chromatographic process described above yields ginsenoside Rb₁ of good quality and can be adapted to the preparation of larger amounts of that ginsenoside. Exceptionally high purity Rb₁ can be obtained by using a mixture of ginsenosides enriched in Rb₁ as the starting material in the process.

In a third specific aspect, the present invention is a composition for alleviating the symptoms of Alzheimer-type senile dementia comprising:

- 25 a) 25-250 mg of Rb₁ or Rg₂ together with a pharmaceutically acceptable carrier therefore,
- b) 25-250 mg of Rb₁ or Rg₂ and a metabolic precursor for acetylcholine, or

-7-

c) 25-250 mg of Rb_1 or Rg_2 and a cholinesterase inhibitor.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a graph of acetylcholine release plotted
5 against log concentration Rb_1 at high and low concentrations of potassium.

Figures 2 and 3 are graphs plotting electrically stimulated 3H -acetylcholine release against time.

Figures 4 and 5 are a graphs of choline uptake plotted
10 against log concentration Rb_1 and against log concentration Rg_1 , respectively.

Figure 6 is a graph of ^{45}Ca uptake at high and low concentrations of potassium.

Figure 7 is a graph showing the effects of Rb_1 on calcium
15 uptake at nerve endings.

Figure 8 is a graph showing the effects of Rb_1 on intracellular calcium concentration in cultured neuroblastoma cells.

Figure 9 is a graph illustrating that Rb_1 itself has no
20 anticholinesterase (AChE) activity.

Figure 10 is a graph showing the inability of Rb_1 to displace QNB from nerve ending receptors.

Figures 11 and 12 are graphs illustrating that the increase in ACh content at nerve endings is not caused by an
25 increase in activity choline acetyltransferase (ChAT).

Figure 13 is a graph illustrating that the increase in the release of ACh is accompanied by an increase in the uptake of

choline into the nerve endings. Figures 14 and 15 are graphs illustrating the kinetics of that uptake.

Figure 16 is a graph illustrating that Rb_1 does not displace radio labelled HC-3 and did not increase the number
5 binding sites in the brain.

Figure 17 is a graph illustrating that the administration of Rb_1 increases the number of choline-uptake sites in the rat.

Detailed Description of the Invention

Our invention is further illustrated by means of the
10 following non-limiting examples:

Example 1: (isolation of Rb_1)

About 1 g of crude ginsenosides obtained by the procedure described by Shoji in "Advances in Chinese Medicinal Materials Research" was dissolved in 10 ml of methanol. The resultant
15 solution was mixed with 10 g of silica gel (Merck 0.040-0.063 mm particle size, 230-400 mesh ASTM). The silica gel was air dried for about 1 hour and then placed in a column for vacuum chromatography, as described by Coll et al, Aust. J. Chem., 30, 1305 (1977), prepacked with 80 g of silica gel. Elution with a
20 solution of chloroform and methanol (85:15) gave a fraction from which 75mg of > 98% pure Rb_1 was obtained. An additional 120 mg of Rb_1 , purity about 60%, was recovered from other fractions of the eluate.

Example 2: (preparation of ginsenosides enriched in Rb_1)

25 600 mg of the crude mixture of ginsenosides obtained by the procedure of Shoji was dissolved in 10 ml water. The aqueous solution was washed with ethyl acetate (2 x 40 ml) and then extracted with a solution of ethyl acetate and 1-butanol (4:1; 4

x 40 ml) followed by extraction with a 1:1 solution of ethyl acetate-1-butanol (2 x 40 ml) and then 1-butanol presaturated with water (2 x 40 ml). The last three extracts were combined and concentrated to give 140 mg of ginsenosides containing about 60% of Rb₁. Use of that enriched mixture as the starting material in Example 1 gave essentially pure Rb₁.

The following examples illustrate that Rb₁ and Rg₁ directly and selectively increase acetylcholine function in the brain and are useful in the treatment of Alzheimer-type senile dementia.

Example 3:

Pinched off nerve endings (synaptosomes) from whole rat brain were first incubated in the presence of the precursor ³H-choline, which is converted intracellularly to ³H-ACh. The release of ACh from synaptosomes was quantitated under low [K] and high [K] conditions intended to simulate physiological stimulation. The addition of Rb₁ increased the release of ³H-ACh as shown in Fig. 1.

Example 4:

Using a different protocol, synaptosomes, which had been previously incubated with ³H-choline, as in the first series of experiments, were continually perfused with HEPES-buffered Krebs solution. The release of ACh was effected by subjecting the synaptosomes to electrical field stimulation, which more closely mimics physiological stimulation. In Fig. 2 and 3, the left panel shows the release pattern in the absence of any added drug, and the right panel shows the release pattern in the presence of 10⁻⁶M drug during the last 25 minutes of perfusion. The results obtained by calculating the ratio of the amounts of ACh released during the two periods of electrical stimulation (the areas under

the curves, S2/S1) indicate that both Rb₁ and Rg₁ increase the electrically stimulated release. In addition, Rg₁ stimulates the resting release of ³H-ACh, as indicated, by the increase in the resting afflux of ³H-ACh when the drug was first added. While the net amount of ³H-ACh released in each run can vary, depending on the amount of protein on the filter and aging of the synaptosomes, the S2/S1 ratio remains quite constant from run to run using a given chamber. Therefore, in each experiment the same chamber was used for both control and test-drug runs.

The stimulation of ACh release is also associated with an increase in the specific uptake of the precursor ³H choline as shown in Figs. 4 and 5. Although the magnitude of stimulation of choline uptake is not as great as the magnitude of stimulation of ACh release, it is a consistent and significant effect, and can still quantitatively account for the increase in release. This suggests a general stimulation of brain cholinergic function. Further, preliminary experiments show that of three cholinergic brain regions examined, cortex, stratum, and hippocampus, stimulation of ACh release from synaptosomes is most pronounced in the hippocampus, a brain region strongly implicated in memory functions, and to a lesser extent in the cortex.

Example 5:

This example confirms that Rb₁ and Rg₁ do not stimulate the release of neurotransmitter by non-selectively depolarizing nerve endings. The effects of Rb₁ on the resting voltage dependent uptake of ⁴⁵Ca into rat brain synaptosomes are shown in Fig. 6. these results indicate that the dramatic stimulation of ³H-ACh release is associated with only a minimal increase in the resting uptake of Ca, upon which ACh release is dependent. If this

-11-

compound were acting as a non-specific depolarizing agent, one would predict the resting uptake of ^{45}Ca would be stimulated several fold, to the same level as the depolarized (52.5 K) uptake.

5 Example 6:

Table 1 below contains data illustrating the effect of Rb_1 on the release of acetylcholine from hippocampal tissue, a brain region which is associated with memory and learning. These data indicate that Rb_1 can stimulate the release of ACh from brain
10 tissue. This effect is observed in the presence or absence (10 mM EGTA) of calcium, which may suggest that the source of the stimulated release of ACh is not from the vesicular pool, as is normally the case, but from the cytoplasmic pool. Furthermore the
15 stimulation of release in the absence of calcium is more pronounced in the simultaneous presence of a cholinesterase inhibitor, paraxon. This type of drug is also known to increase the amount of ACh in the cytoplasm, by virtue of its ability to inhibit intracellular AChE, and this observation would be consistent with the notion that the source of ACh which is
20 stimulated by Rb_1 is the cytoplasm.

Table 1

	CONDITION	RATIO	N
25	with Paraoxon		
	Control	1.053±0.058	29
	10 mM EGTA	0.299±0.062	10
	10^{-7}M Rb_1	2.107±0.284	14
	10^{-6}M Rb_1	1.380±0.112	10
30	10^{-6}M Rb_1 + 10 mM EGTA	1.139±0.338	9

-12-

with ut Paraox n			
5	Control	1.022±0.024	24
	10 mM EGTA	0.357±0.126	6
	10 ⁻⁷ M Rb ₁	2.108±0.542	11
	10 ⁻⁶ M Rb ₁	1.428±0.169	10
	10 ⁻⁶ M Rb ₁ + 10 mM EGTA	0.676±0.194	9

Example 7:

The stimulation of ACh release is not accompanied by an increase in intracellular calcium in nerves. Figure 7 shows the effects of Rb₁ on nerve ending calcium uptake, and Figure 8 shows the effects of Rb₁ on the intracellular calcium concentration in cultured neuroblastoma cells.

Example 8:

Figure 9 shows that Rb₁ itself also has no anticholinesterase activity.

Example 9:

Table 2 below summarizes the effect of Rb₁ on the intracellular stores of choline and ACh when tissues are incubated in low or high potassium, and in the absence or presence of Rb₁. Rb₁ produces an increase in and in the absence or presence of Rb₁. Rb₁ produces an increase in the total ³H contents (choline and ACh) and in the ACh contents of the cytoplasmic fraction (S3), but not in the vesicular (P3) fraction.

Table 2Total ³H contents of Subcellular Fractions

	<u>S3</u>	<u>P3</u>
Low K	166.3±20.1	55.1±4.2
Low K + Rb ₁	214.4±18.9	62.0±5.5
High K	209.0±19.5	87.3±7.3
High K + Rb ₁	216.0±21.8	97.2±8.8

³H ACh Contents of Subcellular Fractions

	<u>S3</u>	<u>P3</u>
Low K	38.6±9.4	7.0±0.72
Low K + Rb ₁	48.5±6.9	7.8±0.3
High K	16.8±0.9	8.0±0.9
High K + Rb ₁	17.8±0.9	6.8±0.7

Example 10:

The stimulation in activity is not mediated by autoreceptors. Figure 10 shows the lack of ability of Rb₁ to bind to nerve ending muscarinic receptors (displace QNB from its nerve ending receptor).

Example 11:

The increase in the nerve ending ACh content is not caused by an increase in the activity of the synthetic enzyme choline acetyltransferase (ChAT) as is shown in Figures 11 and 12.

Example 12:

The increase in the release of ACh is accompanied by an increase in the uptake of the precursor choline into nerve endings, which is shown in Figure 13. The kinetics of the increase in uptake are presented in Figures 14 and 15, and the kinetic contents are presented in Table 3. These results indicate that the increase in choline uptake is not due to an increase in the affinity of the carrier for the substrate choline, but to an increase in the maximum velocity of the carrier.

Table 3

	<u>K_m</u>	<u>V_{max}</u>
Control	12.74 μ M	475
10 ⁻¹⁰ Rb ₁	6.037 μ M	709.4
10 ⁻⁸ Rb ₁	31.1 μ M	4572

The mechanism of the increase in the velocity of the carrier could be accounted for in two ways (1) an increase in the turnover rate of the carriers, or (2) in increase in the number of carriers in the plasma membrane. In order to discriminate between these two possibilities, the number of carrier sites was probed with radiolabelled hemicholinium-3 (HC-3). In in vitro administration experiments, presented in Figure 16, Rb₁ did not displace radiolabelled HC-3 (unlabelled HC-3 was also used as a displacer, as a positive control), and did not increase the apparent number of binding sites. Initially, Rb₁ seems to increase the uptake of choline by simply increasing the turnover rate of the carriers. When rats were administered with Rb₁ (5mg/kg/day) for three days, there was an increase in the number of choline uptake sites, suggesting that chronic administration of the compound increases the number of carriers (Figure 17).

When using Rb₁ and Rg₁ to alleviate the symptoms of Alzheimer-type senile dementia, Rb₁ and Rg₁ can be processed by conventional methods of galenic pharmacy into pharmaceutical preparations for oral or parenteral administration, e.g., to mammals including humans. Conventional excipients are pharmaceutically acceptable organic or inorganic carrier substances suitable for parenteral, enteral or topical application which do not deleteriously react with Rb₁ or Rg₁. Suitable pharmaceutically acceptable carriers include but are not limited to water, salt solutions, alcohols, gum arabic, vegetable oils, polyethylene glycols, gelatine, lactose, amylose, magnesium stearate, talc, silicic acid, viscous paraffin, perfume oil, fatty acid monoglycerides and diglycerides, pentaerythritol fatty acid esters, hydroxy-methylcellulose, polyvinyl pyrrolidone, etc. The

-15-

pharmaceutical preparations can be sterilized and if desired mixed with auxiliary agents, e.g., lubricants, preservatives, stabilizers, wetting agents, emulsifiers, salts for influencing osmotic pressure, buffers, coloring, flavoring and/or aromatic substances and the like which do not deleteriously react with Rb₁ and Rg₁.

For parental application, particularly suitable are injectable sterile solutions, preferably oily or aqueous solutions, as well as suspensions, emulsions, or implants, including suppositories.

For enteral application, particularly suitable are tablets, dragees, suppositories or capsules having talc and/or a carbohydrate carrier or binder or the like, the carrier preferably being lactose and/or corn starch and/or potato starch.

A syrup, elixir or the like can be used wherein a sweetened vehicle is employed. Sustained release compositions can be formulated including those wherein Rb₁ and Rg₁ is protected with differential degradable coatings, e.g., by microencapsulation, multiple coatings, etc.

Depending on the type of mammal to which it is being administered, the daily dosage of Rb₁ or Rg₁ for a mammal weighing 50 kg is generally about 100 -1000 mg. preferably administered 3 or 4 times a day in divided doses. Thus, a suitable dosage form would contain 25 - 250 mg of Rb₁ or Rg₁. Suitable daily dosages of metabolic precursors of acetylcholine, and of cholinesterase inhibitors, are well known to those skilled in the art. For example, acetylcholine precursor, such as choline, usually as its chloride or bitartrate, dimethylaminoethanol, a synthetic precursor of choline, phosphatidylcholine and lecithin, are

-16-

generally administered in amounts ranging from 5 to 50 g/day. Choline and lecithin are sometimes administered in conjunction with nootropic agents such as piracetam, analogues of piracetam and aminopyridines. As for acetylcholinesterase inhibitors, the
5 usual dose for neostigmine is 15-30 mg, for pyridostigmine 60-180 mg, for ambenonium 10-20 mg, and for tetrahydroacridine 25-150 mg. When Rb₁ or Rg₁ is administered together with a metabolic precursor acetylcholine and/or a cholinesterase inhibitor, the dosage form
10 will generally contain the usual dosage of the acetylcholine precursor and/or the usual dosage of the cholinesterase inhibitor. Appropriate dosages and regimens for a given host can be determined using conventional considerations, e.g., by customary comparison of the differential activities of the subject compound
and of a known agent, e.g., by means of conventional
15 pharmacological protocols.



WHAT IS CLAIMED IS:

1. A process for the isolation of ginsenoside Rb₁, which comprises the steps:

(a) dissolving a mixture of ginsenosides in methyl alcohol;

(b) adsorbing the mixture of ginsenosides on silica gel by contacting the solution of the mixture in methyl alcohol with the silica gel and evaporating the alcohol;

(c) placing the silica gel having the mixture of ginsenosides adsorbed thereon in a column for vacuum chromatography prepacked with a fresh portion of silica gel;

(d) passing a mixture of chloroform and methyl alcohol through the column to elute ginsenoside Rb₁; and

(e) recovering ginsenoside Rb₁ from the chloroform and methyl alcohol eluate.

2. A process for the preparation of a mixture of ginsenosides enriched in Rb₁ which comprises the steps:

(a) dissolving a crude mixture of ginsenosides obtained by extraction of ginseng in water;

(b) washing the aqueous solution of mixed ginsenosides with ethyl acetate;

(c) extracting the ethyl alcohol-washed aqueous solution successively with a mixture of 4 volumes of ethyl acetate and 1 volume of 1-butanol, with an equivolume mixture of ethyl acetate and 1-butanol, and with 1-butanol pre-saturated with water;

(d) combining the ethyl acetate-1-butanol and 1-butanol-water extracts; and

(e) recovering a mixture of ginsenosides enriched in Rb₁ from the combined extracts.

3. A process for the preparation of purified Rb₁ which comprises using the ginsenoside mixture enriched in Rb₁ obtained by the process of claim 2 as the mixture of ginsenoside in the process of claim 1.

4. A method for alleviating the symptoms of Alzheimer-type senile dementia, which comprises administering to a mammal affected with Alzheimer-type senile dementia an amount of ginsenoside Rb₁ or of ginsenoside Rg₁ effective to increase the availability of acetylcholine in the cortical and hippocampal regions in the brain of the mammal.

5. A method according to claim 5, wherein the Rb₁ or Rg₁ is administered to the mammal in a daily dosage of 100 - 1000 mg.

6. A method according to claim 6, wherein the daily dosage is administered in portions 3 or 4 times per day.

7. A method according to claim 4, wherein the Rb₁ or Rg₁ is administered together with a metabolic precursor for acetylcholine.

8. A method according to claim 7, wherein the metabolic precursor is lecithin or choline.

9. A method according to claim 4, wherein the Rb₁ or Rg₁ is administered together with a cholinesterase inhibitor.

10. A method according to claim 9, wherein the inhibitor is physostigmine, pyridostigmine or paraoxon.

11. A method according to claim 4, wherein the Rb₁ or Rg₁ is administered together with a metabolic precursor for acetylcholine and a acetylcholinesterase inhibitor.

12. A composition for alleviating the symptoms of Alzheimer-type senile dementia comprising 25-100 mg of Rb₁ or Rb₂.

13. A composition according to claim 12 additionally comprising a metabolic precursor for acetylcholine.

14. A composition according to claim 12 additionally comprising a cholinesterase inhibitor.

15. A composition according to claim 13 additionally comprising a cholinesterase inhibitor.

1 / 15

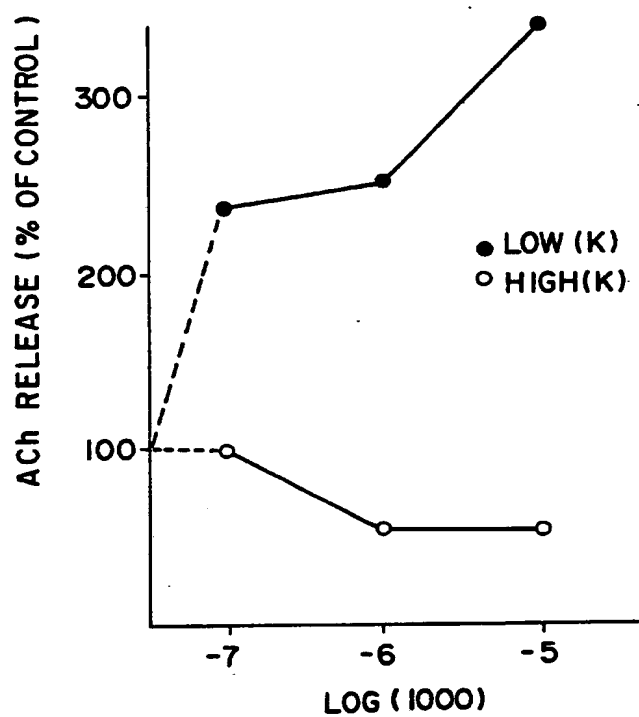


FIG. 1

SUBSTITUTE SHEET

2 / 15

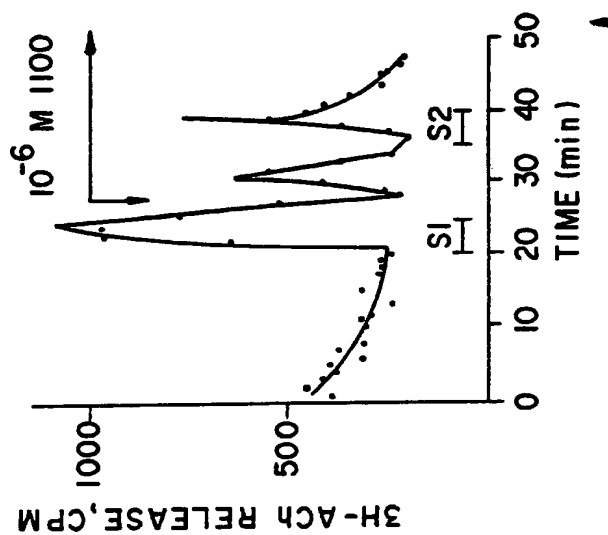


FIG. 2B

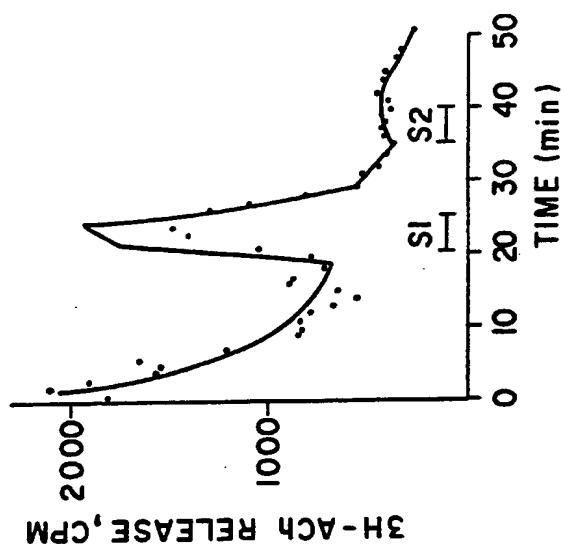


FIG. 2A

SUBSTITUTE SHEET

3 / 15

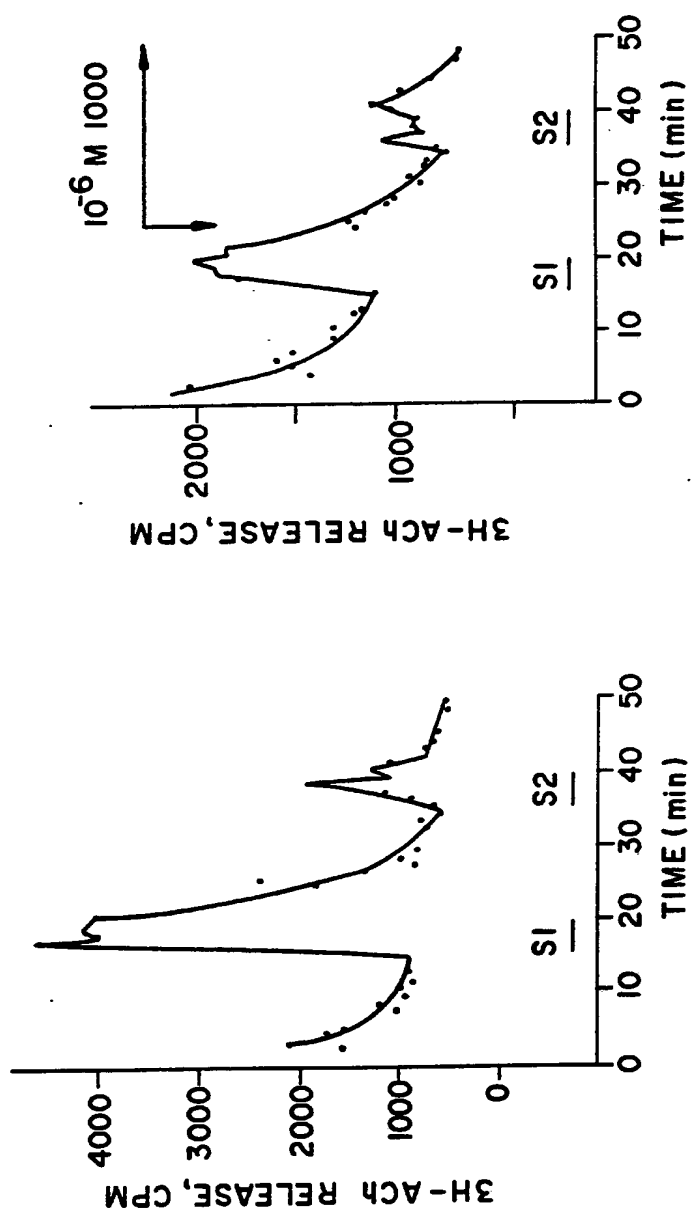


FIG. 3B

FIG. 3A

SUBSTITUTE SHEET



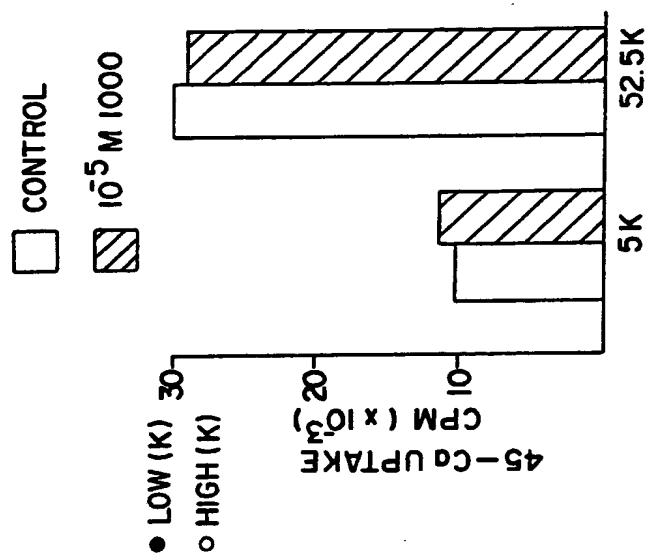


FIG.6

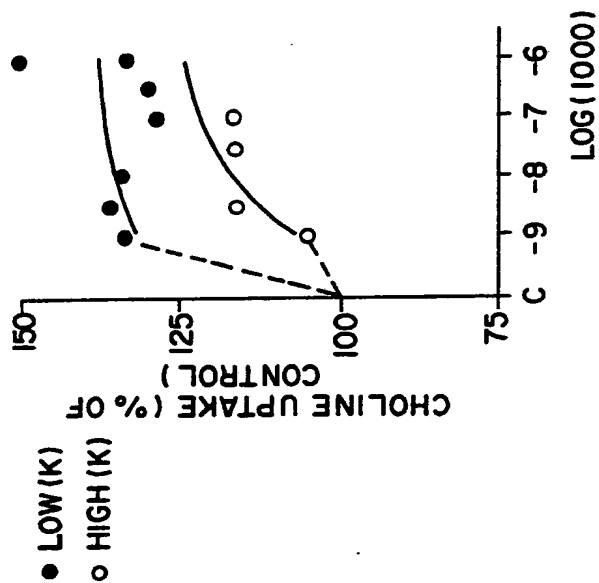


FIG.5

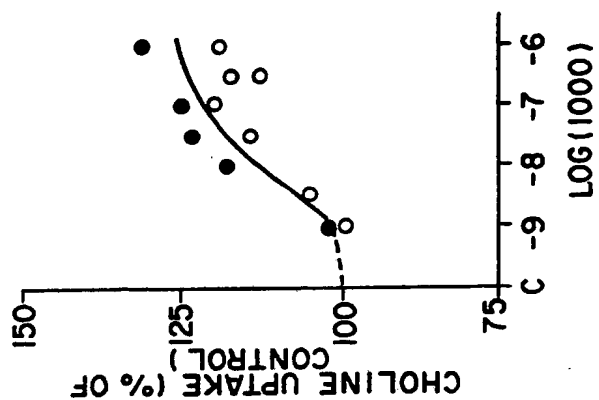


FIG.4

SUBSTITUTE SHEET

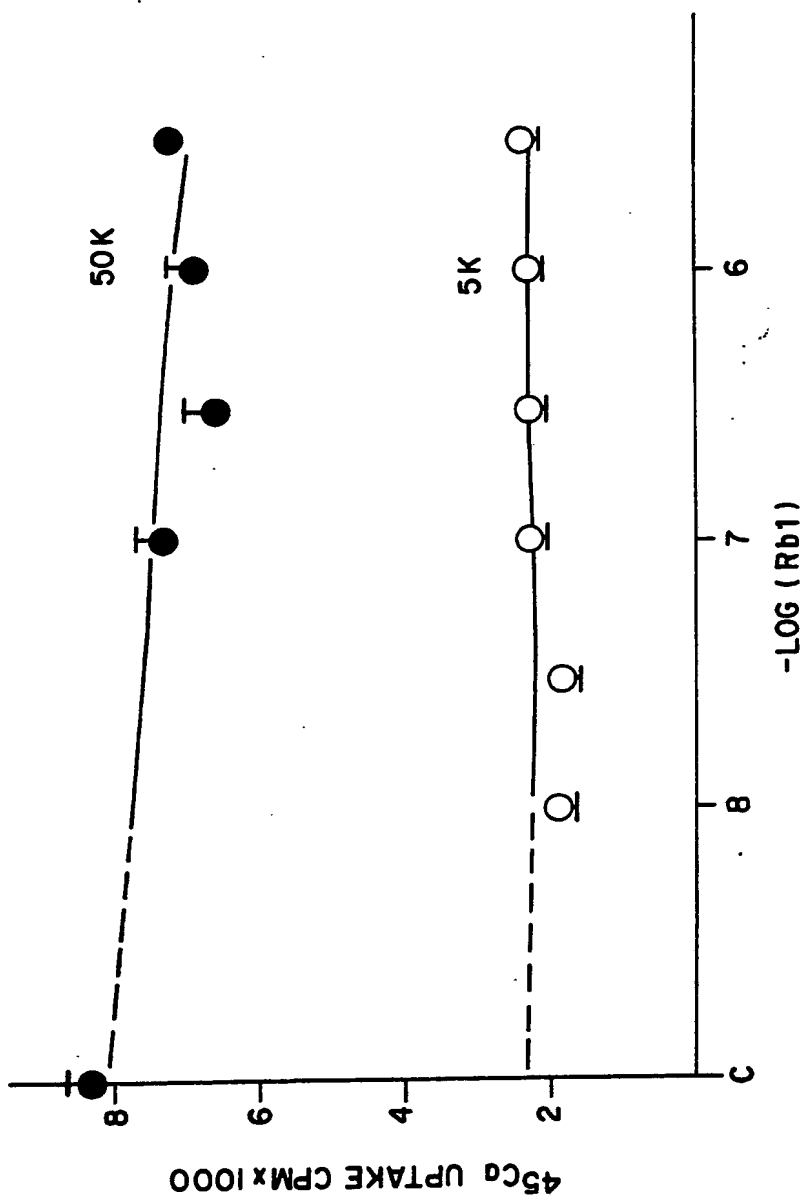


FIG. 7

6 / 15

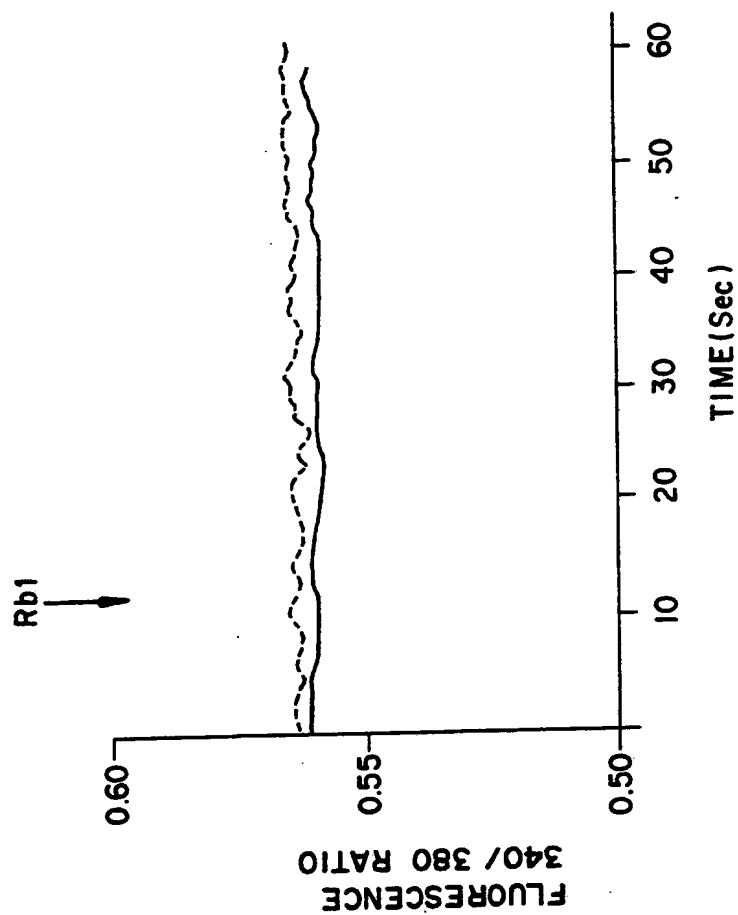


FIG. 8

SUBSTITUTE SHEET



7/15

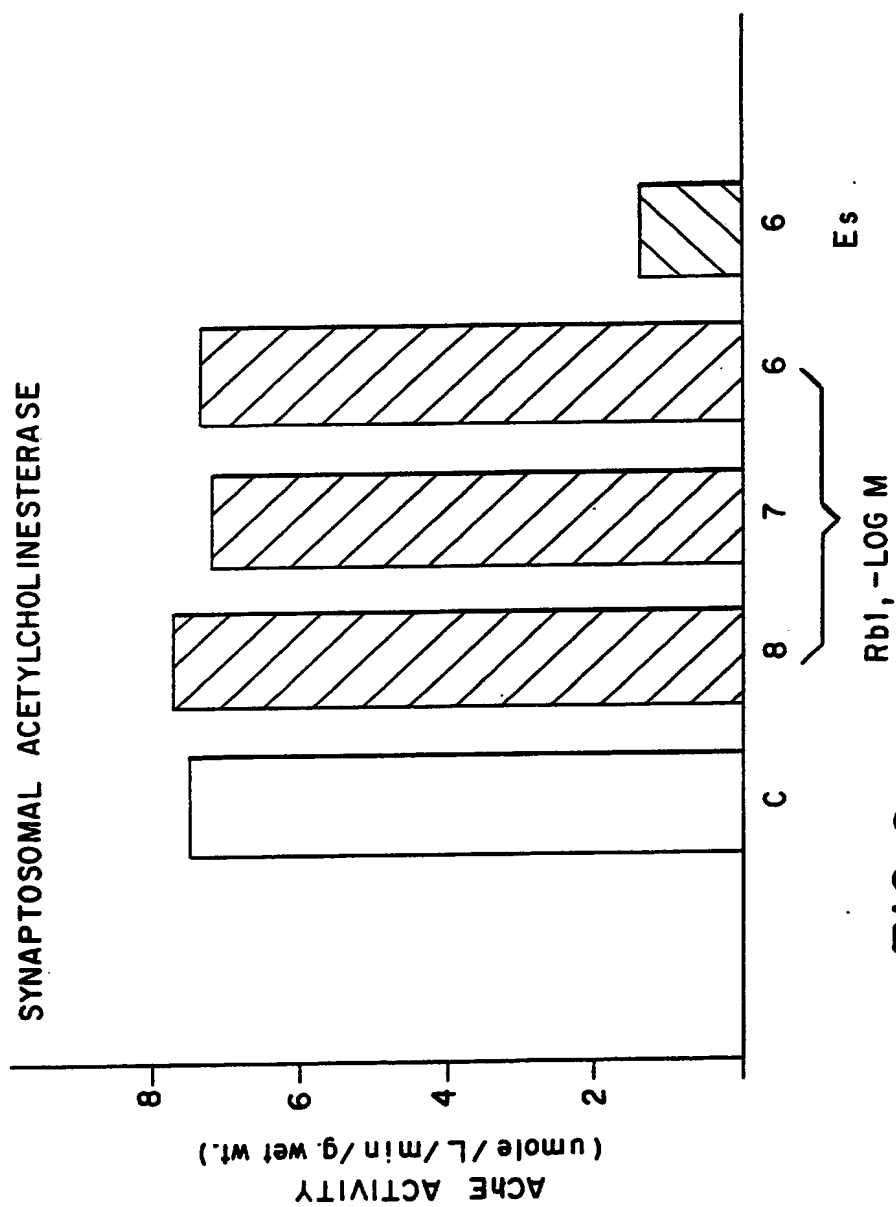


FIG. 9

SUBSTITUTE SHEET



8 / 15

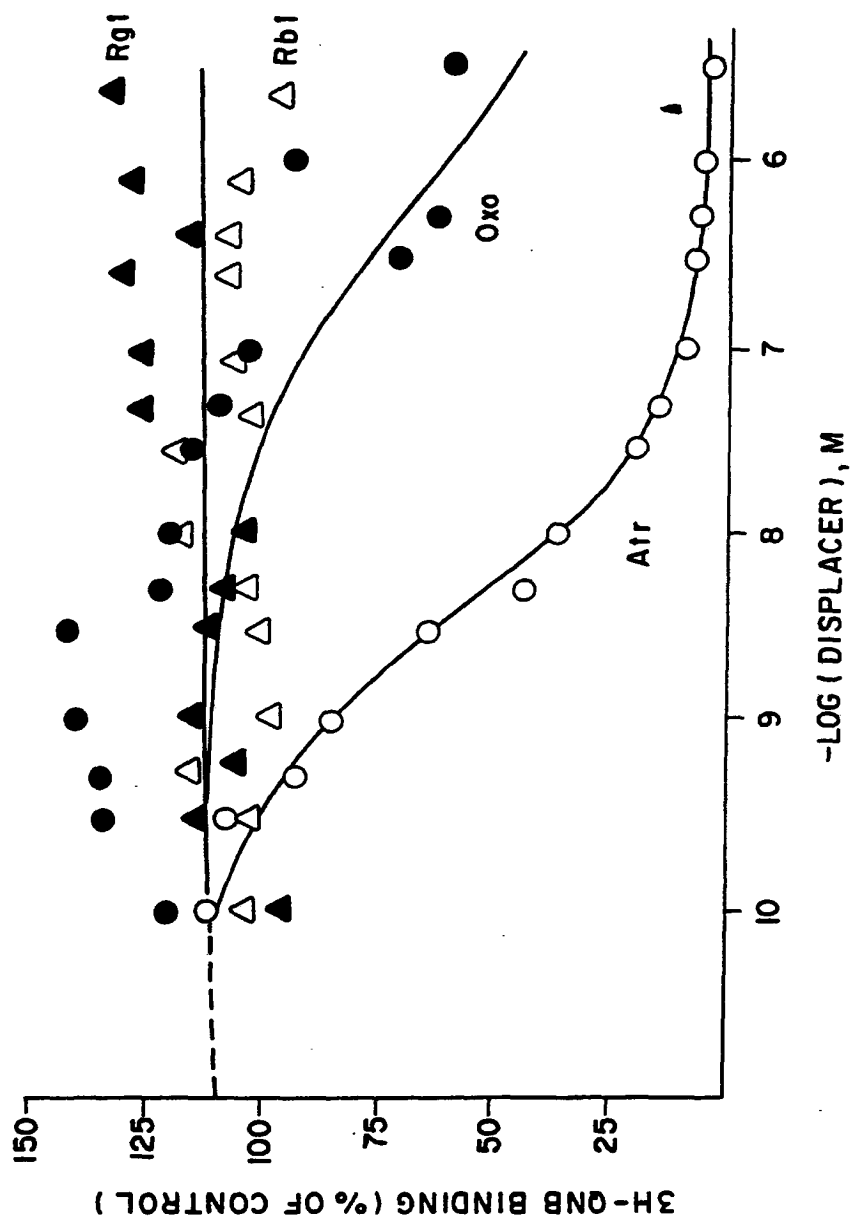


FIG. 10

SUBSTITUTE SHEET



9/15

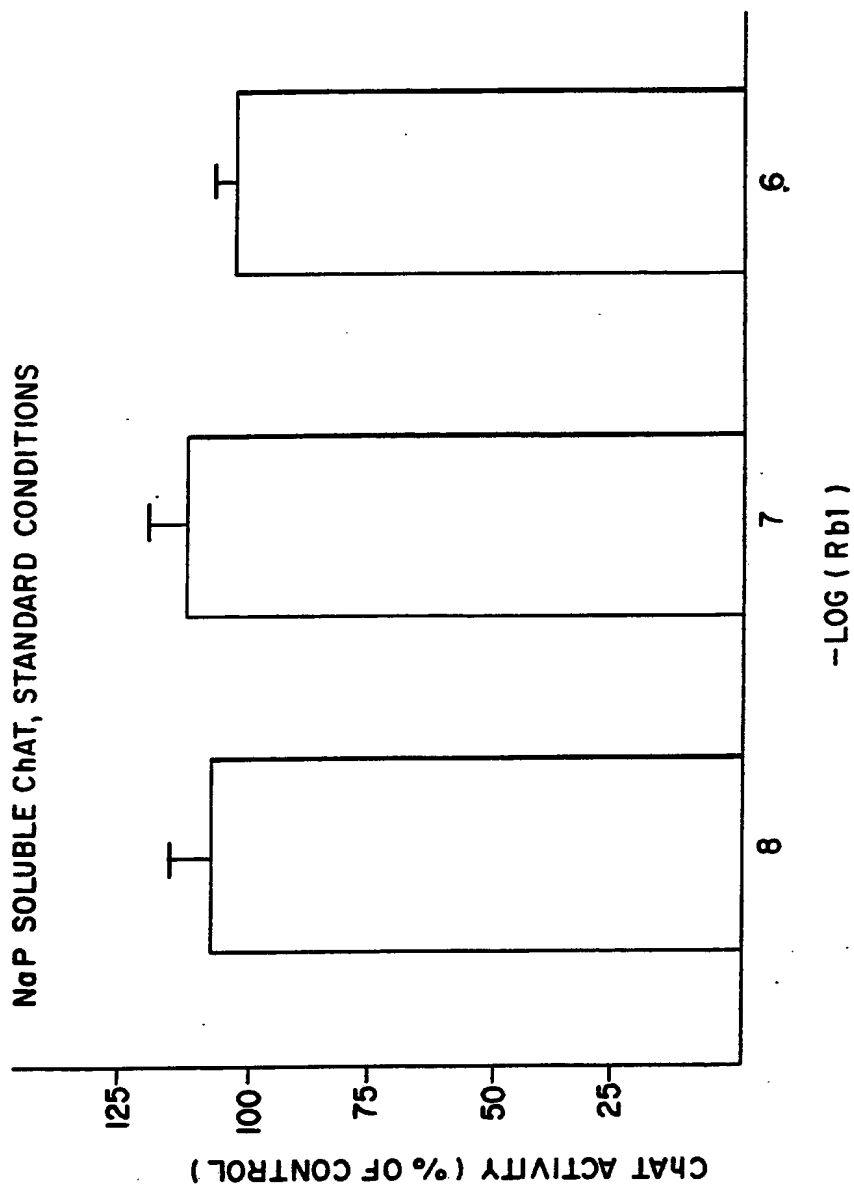


FIG. 11

SUBSTITUTE SHEET



10 / 15

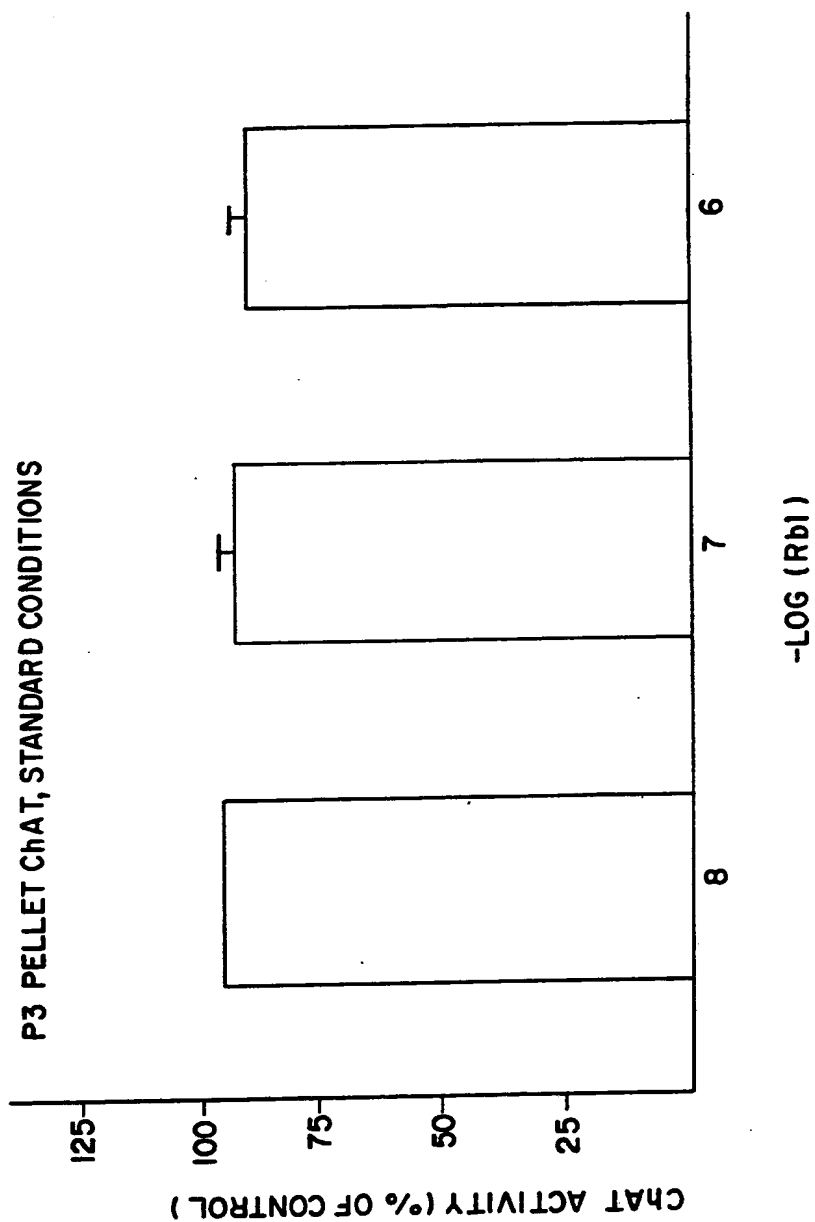


FIG. 12

SUBSTITUTE SHEET



11 / 15

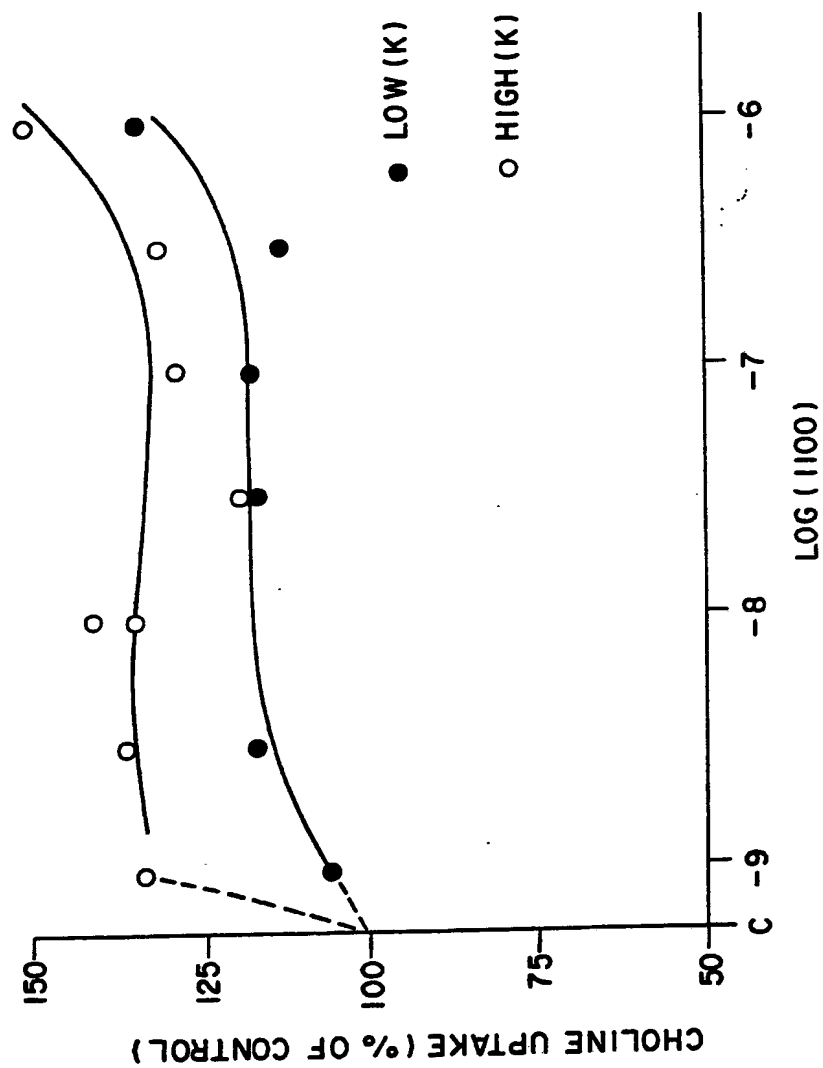


FIG. 13

SUBSTITUTE SHEET



12 / 15

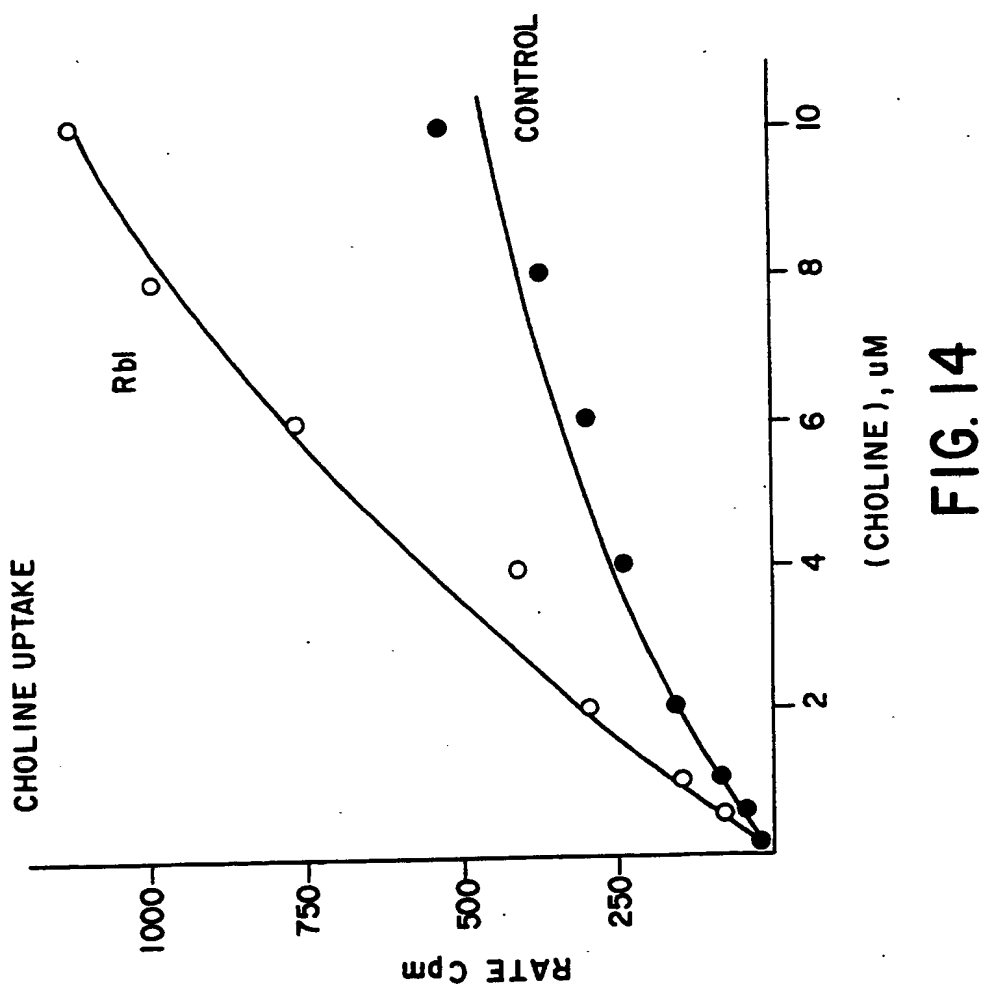


FIG. 14

SUBSTITUTE SHEET



13 / 15

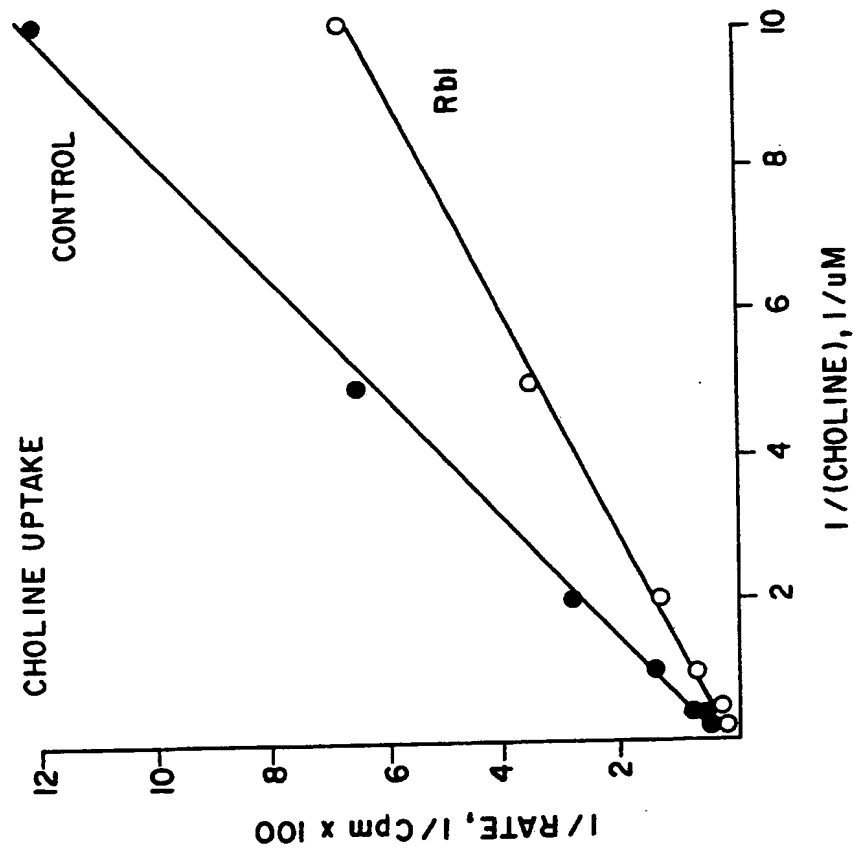


FIG. 15

SUBSTITUTE SHEET



14 / 15

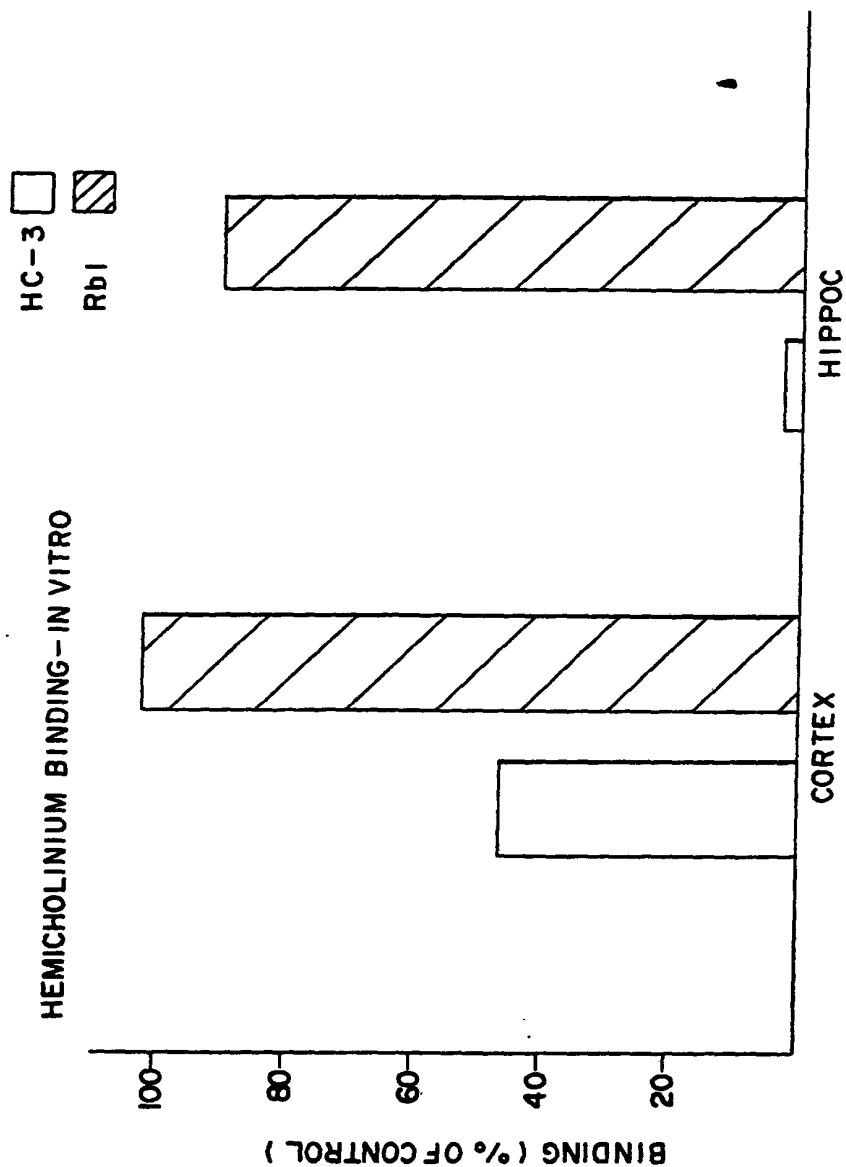


FIG. 16

SUBSTITUTE SHEET

15 / 15

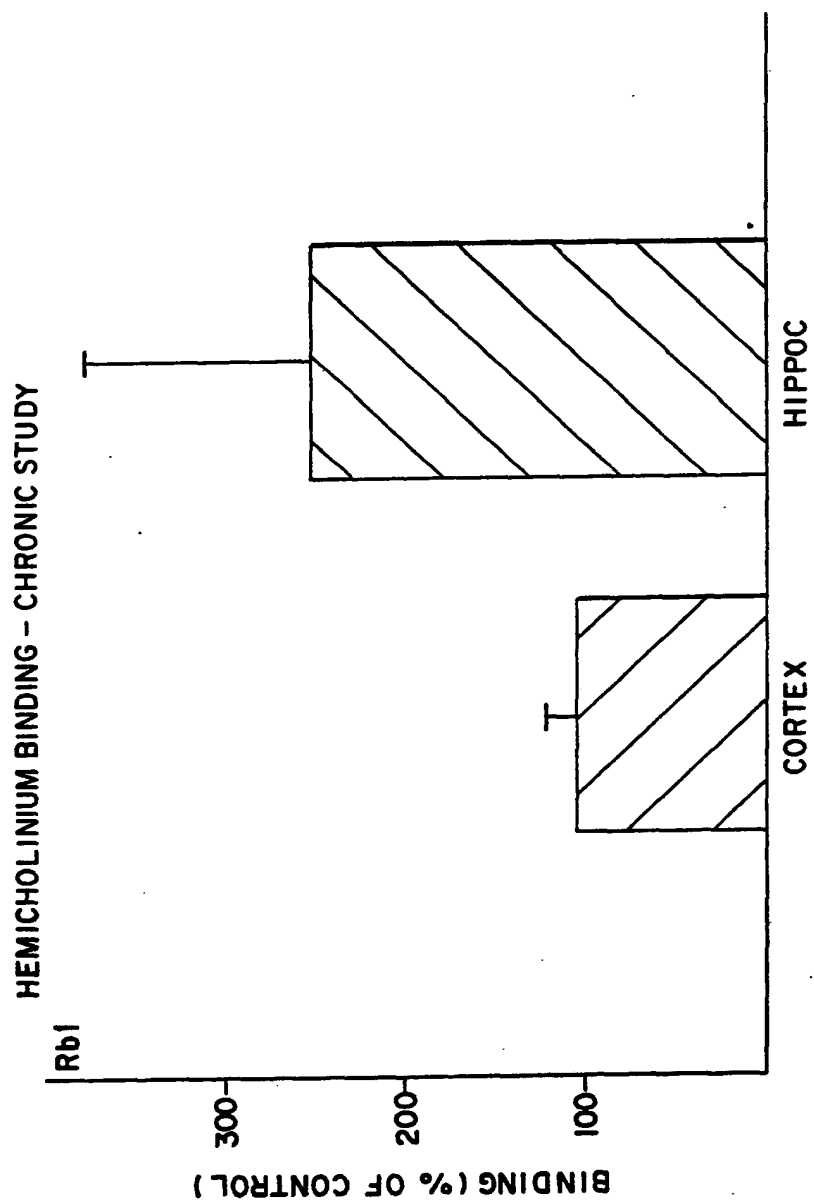


FIG. 17

SUBSTITUTE SHEET



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US90/00121

I. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or in both National Classification and IPC U.S. 23/23OR 514/54&879 IPC. (5) G01N 31/00, A01N 31/00 CL. 536/5, 127&128 424/195.1 A61K 31/715		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ²		
Classification System	Classification Symbols	
U.S.	23/23OR 536/5, 127&128 424/195.1 514/54&879	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	US, A, 4,157,894 (BOMBARDELLI) 12 June 1979 (See entire document)	1-15
A	US, A, 4,317,816 (ARICHI ET AL) 02 MARCH 1982 (See entire document)	1-15
X A	US, A, 4,339,442 (TAKEMOTO ET AL) 13 July 1982 (See entire document)	1-3 4-15
A	US, A, 4,446,130 (HACHIYA ET AL) 01 MAY 1984. (See entire document)	1-15
X A	US, A, 4,621,137 (MIYAKE ET AL) 04 November 1986. (See entire document)	12 1-11 and 13-15
A	US, A, 4,647,460 (LEE) 03 March 1987. (See entire document)	1-15
A	US, A, 4,684,628 (LIU) 04 August 1987. (See entire document)	1-15
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
12 MARCH 1990		18 APR 1990
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
ISA/US		Ronald W. Griffin

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	US, A, 4, 687,761 (LIU) 18 August 1987 (See entire document)	1-15
<u>X</u> A	US, A, 4,755,504 (LIU) 05 July 1988 (See entire document)	<u>12-</u> 1-11 and 13-15
A,P	US, A, 4,814,339 (ROTONDO) 21 March 1989 (See entire document)	1-15
A,P	US, A, 4,837,219 (HUTTERER) 06 June 1989 (See entire document)	1-15
A, P	US, A, 4,847,082 (SABIN) 11 July 1989 (See entire document)	1-15
A,P	US, A, 4,851,414 (SHIOZAKI ET AL) 25 July 1989 (See entire document)	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JQ Li et al., "Study on the anti-apoptotic mechanism of ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons", Acta Pharmaceutica Sinica, Vol.32, No.6, pp.406-410, 1997	2-5, 9, 18-21 81, 83-89
X	Sung-Ho Kim et al., "Radioprotective Effect of Red Ginseng in Irradiated Mice with High and Low Dose of Radiation", Korean J. Ginseng Sci., Vol.22, No.1, pp.66-72, 1998	2-5, 9
X Y	ZHANG Ying-Ge et al., "Influences of ginsenosides Rb1 and Rg1 on reversible focal brain ischemia in rats", Acta Pharm. Sinica, Vol. 17, No.1, pp.44-48, 1996	18-21, 24, 25, 43, 47 22, 23, 27, 44-46, 81-89
X Y	Neuroscience Research, Vol.28, pp.191-200, 1997	18-21 81-89
X Y	Acta Pharmaceutica Sinica, Vol.30, No.9, 1995	18-21 81-89

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 September, 2000 (18.09.00)

Date of mailing of the international search report
26 September, 2000 (26.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile N .

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04102

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZANG Ying-Ge et al., "Protective Effects of Total Saponins of Pana Ginseng on ischemia-reperfusion injury in rat brains", Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, Vol.8, No.1, pp.7-12, 1994	18-21,37-39
X	CHU, Guoxiang et al., "Protective effect of ginsenoside on acute cerebral ischemia/reperfusion injury of rats", Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, Vol.3, No.1, pp.18-21, 1989	37-39,43,47,48
X Y	JIANG Yan et al., "Influences of ginsenosides Rb1, Rb2, and Rb3, on electric and contractile activities of normal and damaged cultured myocardiocytes", Acta Pharmacologica Sinica, Vol.13, No.5, pp.403-406, 1992	40,42 41
X Y	FANG Yun-xiang et al., "Beneficial changes in prostacyclin and thromboxane A ₂ by ginsenosides in myocardial infarction and reperfusion injury of dogs", Acta Pharmacologica Sinica, Vol.7, No.3, pp.222-226, 1986	40,44,49,52 41,42
X Y	Xiu Chen, "CARDIOVASCULAR PROTECTION BY GINSENOSES AND THEIR NITRIC OXIDE RELEASING ACTION", Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol.23, No.8, pp.728-732, 1996	40,42 41
X Y	LI Yuan-Jian, "THE PROTECTIVE EFFECT OF GINSENOSES AND ITS COMPONENTS ON MYOCYTES ANOXIA/REOXYGENATION AND MYOCARDIAL REPERFUSION INJURY", Acta Pharmaceutica Sinica, Vol.22, No.1, pp.1-5, 1987	40,42 41
A	Matao Kanaoka et al., "Studies on the Enzyme Immunoassay of Bio-active Constituents in Oriental Medicinal Drugs. VI. Enzyme Immunoassay of Ginsenoside Rb1 from Panax ginseng", Chem. Pharm. Bull., Vol.40, No.2, pp.314-317, 1992	74-80
Y	Noriko KONDO et al., "Studies on the Constituents of Himalayan Ginseng, Panax pseudoginseng. I. The Structure of the Saponins", Chem. Pharm. Bull., Vol.21, No.13, pp.2702-2711, 1973	74-80
P,X	JP, 2000-159793, A (Taisho Pharmaceut. Co., Ltd.), 13 June, 2000 (13.06.00), (Family: none)	2,3,5,9,40,41
X	JP, 6-316527, A (Tetsuo MORI), 15 November, 1994 (15.11.94), (Family: none),	18,19
X Y	WO, 90/08315, A (PANG P K T), 26 July, 1990 (26.07.90), & JP, 4-504414, A & US, 4966893, A & EP, 453515, A & US, 513878, A & DE, 69032201, B & KR, 160104, B	18-21 81-89

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04102

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04102

Continuation of Box. No. II of continuation of first sheet (1)

Inventions as set forth in claims 1, 2, 18, 40 and 43 pertain respectively to 1) medicinal compositions for promoting the expression of a cell death inhibitory gene product Bcl-XL, 2) medicinal compositions for inhibiting apoptosis or apoptosis-like cell death, 3) medicinal compositions for treating, preventing or managing brain and nerve diseases, 4) medicinal compositions for treating, preventing or managing heart diseases, and 5) preparations for intravenous administration, each comprising ginseng, its extract, ginseng components, metabolites thereof or salts thereof. Inventions as set forth in claims 53, 56, 58 and 60 pertain respectively to 5) medicinal compositions for preventing, treating, managing or ameliorating edema in vital tissues, 6) medicinal compositions for preventing, treating or managing bedsores, 7) medicinal compositions for preventing, treating or managing neuroparalysis, and 8) medicinal compositions for preventing, treating or managing urination disorder or dyschezia, each comprising ginsenoside Rb1, its metabolites or salts thereof.

Invention as set forth in claim 74 pertains to 9) dihydroginsenoside Rb1 represented by the structural formula (II), its metabolites or salts thereof.

Invention as set forth in claim 81 pertains to 10) a method for searching an active ingredient for preventing, managing or treating diseases in nerve tissues or spinal tissues by using as a lead compound ginseng, its extract, ginseng components, metabolites thereof or salts thereof.

Invention as set forth in claim 86 pertains to 11) use of one of ginseng saponin fractionation components or metabolites thereof as a lead compound in searching remedies for nerve trauma, remedies for spinal injury, remedies for head trauma, brain cell protecting agents or nerve cell protecting agents.

Since the above subjects 1) to 11) differ from each other in use or the like, these inventions as set forth in 1) to 11) are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Such being the case, this international application does not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K35/78, A61K31/704, C07J17/00, A61P9/08, A61P25/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 32, no. 6, p406-410, 1997 "Study on the anti-apoptotic mechanism of ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons" JQ Li et al	2-5, 9, 18-21 81, 83-89
X	Korean J. Ginseng Sci., vol. 22, no. 1, p66-72, 1998 "Radioprotective Effect of Red Ginseng in Irradiated Mice with High and Low Dose of Radiation" Sung-Ho Kim et al	2-5, 9
X Y	Acta Pharm. Sinica, vol. 17, no. 1, p44-48, 1996 "Influences of ginsenosides Rb1 and Rg1 on reversible focal brain ischemia in rats" ZHANG Ying-Ge et al	18-21, 24, 25, 43, 47 22, 23, 27, 44-

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.09.00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀

4C

8415

電話番号 03-3581-1101 内線 3452



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Neuroscience Research vol. 28, p191-200, 1997	46, 81-89
Y		18-21
X	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 30, no. 9, 1995	81-89
Y		18-21
X	Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 8, no. 1, p7-12, 1994 "Protective Effects of Total Saponins of Panax Ginseng on ischemia-reperfusion injury in rat brains" ZHANG Ying-Ge et al	81-89
X	Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi, vol. 3, no. 1, p18-21, 1989 "Protective effect of ginsenoside on acute cerebral ischemia/reperfusion injury of rats" CHU, Guoxiang et al	18-21, 37-39
X	Acta Pharmacologica Sinica, vol. 13, no. 5, p403-406, 1992 "Influences of ginsenosides Rb1, Rb2, and Rb3, on electric and contractile activities of normal and damaged cultured myocardiocytes" JIANG Yan et al	37-39, 43, 47, 48
Y		40, 42
X	Acta Pharmacologica Sinica, vol. 7, no. 3, p222-226, 1986 "Beneficial changes in prostacyclin and thromboxane A ₂ by ginsenosides in myocardial infarction and reperfusion injury of dogs" FANG Yun-xiang et al	41
Y		40, 44, 49, 52
X	Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, vol. 23, no. 8, p728-732, 1996 "CARDIOVASCULAR PROTECTION BY GINSENOSES AND THEIR NITRIC OXIDE RELEASING ACTION" Xiu Chen	41, 42
Y	Acta Pharmaceutica Sinica, vol. 22, no. 1, p1-5, 1987 "THE PROTECTIVE EFFECT OF GINSENOSES AND ITS COMPONENTS ON MYOCYTES ANOXIA/REOXYGENATION AND MYOCARDIAL REPERFUSION INJURY" LI Yuan-Jian	40, 42
A	Chem. Pharm. Bull., vol. 40, no. 2, p314-317, 1992 "Studies on the Enzyme Immunoassay of Bio-active Constituents in Oriental Medicinal Drugs. VI. Enzyme Immunoassay of Ginsenoside Rb1 from Panax ginseng" Matsuoka Kanaoka et al	41
Y	Chem. Pharm. Bull., vol. 21, no. 13, p2702-2711, 1973 "Studies on the Constituents of Himalayan Ginseng, Panax pseudoginseng. I. The Structure of the Saponins" Noriko Kondo et al	40, 42
P, X	JP, 2000-159793, A (大正製薬株式会社) 13. 6月. 2000 (13. 06. 00) ファミリーなし	41
X	JP, 6-316527, A (毛利哲朗) 15. 11月. 1994 (15. 11. 94) ファミリーなし	2, 3, 5, 9, 40
X	WO, 90/08315, A (PANG P K T) 26. 7月. 1990 (26. 07. 90) & JP, 4-504414, A&US, 4966893, A&EP, 453515, A&US, 5137878, A&DE, 69032201, B&KR, 160104, B	18, 19
Y		18-21
		81-89

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1、2、18、40、43は、薬用人参もしくはそのエキス又は薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩を含有してなるそれぞれ1) 細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL の発現を促進させるための医薬組成物、2) 細胞のアポトーシス又はアポトーシス様細胞死抑止用医薬組成物、3) 脳・神経疾患の治療、予防又は処置のための医薬組成物、4) 心臓疾患の治療、予防または処置のための医薬組成物又は5) 静脈内投与製剤に係わる発明である。また、請求の範囲 53、56、58、60は、ジンセノサイド Rb1 もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるそれぞれ5) 生体組織の浮腫を予防・治療・処置又は軽減するための医薬組成物、6) 褥創の予防・治療・処置用医薬組成物、(続き有り)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅱ欄の続き

7) 神経麻痺の予防・治療・処置用医薬組成物、8) 排尿障害もしくは排便障害の予防・治療・処置用医薬組成物に係わる発明である。

また、請求項74は、9) 構造式(Ⅱ)で示されるジヒドロジンセノサイドRb1もしくはその代謝産物又はそれらの塩に係わる発明である。

また、請求項81は、10) 薬用人参もしくはそのエキスまたは薬用人参成分もしくはそれらの代謝産物又はそれらの塩をリード化合物として、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索する方法に係わる発明である。

また、請求項86は、11) 神経外傷治療剤、脊髄損傷治療剤、頭部外傷治療剤、脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としての薬用人参サポニン成分構成成分のいずれか又はその代謝産物の使用に係わる発明である。

そして、これらの上記1)～11)は、使用用途等において、それぞれ異なるものであるので、1)～11)に記載された発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められず、この国際出願は単一性を満たしているものとは認められない。